



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA
HIPERHOMOCISTEINÉMIA NO CONTEXTO DAS DOENÇAS
CARDIOVASCULARES**

Trabalho submetido por
Tatiana Soraia dos Santos Mendes
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2015



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA
HIPERHOMOCISTEÍNEMIA NO CONTEXTO DAS DOENÇAS
CARDIOVASCULARES**

Trabalho submetido por
Tatiana Soraia dos Santos Mendes
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Gabriela Almeida

outubro de 2015

Agradecimentos

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz por me ter acolhido nestes que foram os melhores anos da minha vida e que serão recordados com grande saudade.

A todo o corpo de docentes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas que me acompanharam, pelos conhecimentos transmitidos, para que um dia possa desempenhar a profissão de farmacêutica com excelência. Um especial obrigada à professora Gabriela Almeida por me ter orientado e ajudado ao longo de todo este trabalho, pela sua disponibilidade, o seu apoio e dedicação incansáveis.

A todos os amigos que a faculdade trouxe e que me acompanharam desde o início nesta aventura. Aos meus colegas de turma, ao António, ao Filipe, ao Mickael, ao Pedro C. e ao Pedro V. por tornarem este curso tão mais divertido. À Carolina e à Fátima pela amizade incondicional. À Cláudia, à Cristiana e à Filipa por me acompanharem desde o início, por todos os momentos partilhados, por todas as brincadeiras, e também todas as brigas, que fizeram estes cinco anos valerem tanto a pena. Por serem uma segunda família, não de sempre, mas para sempre.

Ao João por estes quatro anos de amor e carinho, por todo o apoio e compreensão.

Por último, mas não em último, a toda a minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão por acreditarem em mim desde sempre, por todo o amor, esforço e dedicação. Também pelo exemplo que me deram, pela força que me incutiram e por me ajudarem e apoiarem nos bons momentos mas, também, por me levantarem quando mais precisei.

Resumo

De entre todas as patologias que afectam o Homem, as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte a nível mundial. Assim, é importante perceber a etiologia destas patologias bem como os mecanismos que lhes dão origem. Deste modo, e visto que muitos destes eventos não conseguem ser compreendidos pelos factores de risco tradicionais, novos factores têm surgido, como é o caso da hiperhomocisteinémia. Esta é uma condição que promove o aumento dos níveis de homocisteína em circulação, estando intimamente relacionada com o aparecimento precoce de doenças cardiovasculares. Contudo, o papel da hiperhomocisteinémia na promoção destas doenças não está totalmente estabelecido. Sabe-se que a homocisteína elevada está na génese de diversos mecanismos de lesão vascular, provocando, entre outros, disfunção endotelial. Este é um dos primeiros passos para a evolução da aterosclerose, uma patologia que origina distúrbios cardiovasculares, e que se caracteriza por ser um estado inflamatório crónico.

Deste modo, foi necessário o desenvolvimento de técnicas de detecção precoce que actuassem como medidas preventivas para o aparecimento de disfunções cardiovasculares. O diagnóstico e quantificação da homocisteína são, normalmente, feitos por meio de métodos cromatográficos dos quais se destaca a HPLC.

Quanto ao controlo dos níveis de homocisteína, é imprescindível o desenvolvimento de meios para o tratamento da hiperhomocisteinémia. Actualmente, este é feito por suplementação com ácido fólico, vitaminas B₆ e B₁₂. Porém, ainda permanecem dúvidas quanto ao papel da homocisteína, não se sabendo se esta é uma causa ou uma consequência das doenças cardiovasculares.

Palavras-Chave: Hiperhomocisteinémia, Doenças cardiovasculares, Aterosclerose, Ácido fólico

Abstract

Among all the pathologies affecting humans, cardiovascular diseases are the leading death causes worldwide. So, it is important to understand the etiology of these disorders as well as the mechanisms that give rise to them. Thus, because many of these events cannot be understood by traditional risk factors, new factors have emerged, which is the case of hyperhomocysteinemia. This is a condition that promotes the increase of homocysteine levels in circulation, and is closely related with early onset of cardiovascular diseases. However, the role of hyperhomocysteinemia in the promotion of this it is not fully established. It is known that elevated homocysteine is one factor for vascular injury, causing, among others, endothelial dysfunction. This is one of the first steps in the development of atherosclerosis, a condition that causes cardiovascular disorders, and it is characterized as a chronic inflammatory state.

Thus, the development of early detection techniques that acted as preventive techniques that acted as preventive measures for occurrence of cardiovascular disorders is required. The diagnosis and quantification of homocysteine are typically performed by chromatographic methods (HPLC).

As for the control of homocysteine levels, is essential the development of new therapies for the treatment of hyperhomocysteinemia. Currently, this is done by supplementation with folic acid, vitamins B₆ and B₁₂. However, we still not know whether hyperhomocysteinemia is a cause or a consequence cardiovascular diseases.

Keywords: Hyperhomocysteinemia, Cardiovascular diseases, Atherosclerosis, Folic acid

Índice Geral

Índice de Figuras	11
Índice de Tabelas	11
Lista de Abreviaturas.....	13
1. Introdução.....	17
2. O Aminoácido Homocisteína	21
2.1. Caracterização da Homocisteína, Estrutura e suas Formas	21
2.2. Metabolismo da Homocisteína	22
3. Hiperhomocisteinémia	27
3.1. Classificação da Hiperhomocisteinémia	27
3.2. Etiologia da Hiperhomocisteinémia.....	28
3.2.1. Factores Genéticos.....	28
3.2.2. Factores Nutricionais	29
3.2.3. Factores Fisiológicos	30
3.2.4. Outros Factores.....	31
3.3. Hiperhomocisteinémia e Doenças Cardiovasculares	32
3.3.1. Mecanismos de Lesão Vascular da Hiperhomocisteinémia.....	34
3.4. Hiperhomocisteinémia e Doenças Neurodegenerativas.....	44
3.4.1. Mecanismos de Lesão Neuronal da Hiperhomocisteinémia.....	46
4. Métodos de Diagnóstico e Quantificação da Hiperhomocisteinémia	49
4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	51
4.2. Cromatografia Gasosa.....	56
4.3. Electroforese Capilar	57
4.4. Imunoensaios	58
5. Perspectivas de Tratamento da Hiperhomocisteinémia	61
6. Conclusão	71
Bibliografia.....	73

Índice de Figuras

Figura 1 –Percentagem de mortes por principais causas de morte em Portugal, desde 1988	18
Figura 2 - Diferentes formas de homocisteína em circulação no sangue.	22
Figura 3 a) - Metabolismo da homocisteína, via de remetilação e via de transulfuração	24
b) Metabolismo da homocisteína, via de remetilação alternativa.....	24
Figura 4 - Mecanismos de lesão da homocisteinémia nas doenças cardiovasculares ...	35
Figura 5 - Progressão da lesão aterosclerótica.....	37

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Factores predisponentes da hiperhomocisteinémia	28
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos vários métodos de detecção.	56
Tabela 3 - Principais vantagens e desvantagens dos vários tipos de imunoensaios.	59
Tabela 4 - Principais ensaios clínicos realizados na última década, e suas características.	67

Lista de Abreviaturas

ABD-F- 4-aminossulfonil-7-fluoro-2,1,3-benzodiazol

Ac- Anticorpo

ACKD- *Advanced Chronic Kidney Disease*

ADMA- *Asymmetric dimethylarginine* - Dimetilarginina assimétrica

AVC- Acidente vascular cerebral

CBS- Cistationina β -sintetase

DGS- Direcção-Geral da Saúde

DTE- Ditioeritritol

DTT- Ditiotreitól

BVAIT- *The B-Vitamin Atherosclerosis Intervention Trial*

EIA- *Enzyme immunoassay* - Enzimoimunensaio

eNOS- *Nitric oxide synthetase* - Sintetase do óxido nítrico

FPIA- *Fluorescence polarization immunoassay* - Imunoensaio de fluorescência por polarização

Gpx-1- Glutathione peroxidase-1

GS-MS- *Gas chromatography-mass spectrometry* - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

Hcy- *Homocysteine* - Homocisteína

Hcy-Tl- *Homocysteine thiolactone*- Homocisteína-tiolactona

HOPE 2- *The Heart Outcomes Prevention Evaluation*

HOST- *Homocysteinemia in Kidney and End Stage Renal Disease*

HPLC- *High performance liquid chromatography*- Cromatografia líquida de alta eficiência

ICL- *Chemiluminescence immunoassay* – Imunoensaio por quimioluminescência

LDL- *Low density lipoprotein* - Lipoproteína de baixa densidade

mBrB- *Monobromobimane* - Monobromobimano

MCP-1- *Monocyte chemoattractant protein 1*

MS- Metionina sintetase

MTHFR- Metilenotetrahidrofolato redutase
 NMDA- D-metil D-aspartato
 NO- *Nitric oxide* - Óxido nítrico
 NORVIT- *Norwegian Vitamin Trial*
 OMS- Organização mundial de saúde
 OPA- ortoftaldeído
 PON 1- Paraoxonase 1
 ROS- *Reactive oxygen species* - Espécies reactivas de oxigénio
 SAH- S-adenosilhomocisteína
 SAM- S-adenosilmetionina
 SBD-F - 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonato
 SU.FOL.OM3- *Supplementation with Folate, Vitamin B₆ and B₁₂ and/or Omega-3 Fatty Acids*
 TBP- tri-n-butil fosfina
 TCEP- *tris-(2-carboxyethyl) phosphine* - tris-(2-carboxietil) fosfina
 VISP- *Vitamin Intervention for Stroke Prevention*
 VITATOPS- *Vitamins To Prevent Stroke*
 WAFACS- *Women's Antioxidant and Folic Acid Cardiovascular Study*
 WENBIT- *Western Norway B-vitamin Intervention Trial*

1. Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte nos países desenvolvidos, sendo que em 2012 cerca de 30% de todas as mortes a nível mundial foram provocadas por este tipo de patologias (Mendis, Puska, & Norrving, 2011). As doenças cardiovasculares provocam a morte de cerca de 17,3 milhões de pessoas todos os anos, maioritariamente em doentes com menos de 60 anos (Mendis et al., 2011).

Portugal e a Europa não são excepção à tendência mundial de elevada prevalência deste tipo de patologias. Segundo a Direcção-Geral de Saúde (DGS), as doenças cerebrovasculares e do aparelho circulatório são as principais causas de morte no nosso país (Direcção-Geral da Saúde, 2012). Contudo, e apesar da redução do número de mortes verificado ao longo dos últimos anos, isto não resultou na diminuição da incidência das doenças cardiovasculares na população em geral (Direcção-Geral da Saúde, 2012; Ferreira, Neves, & Rodrigues, 2014). A comprovar estes dados no documento: “Portugal- Doenças Cérebro-Cardiovasculares em números 2014”, em que a DGS analisou as principais causas de morte em Portugal, concluiu que, mesmo apesar do decréscimo de 44.4% para 30.4% verificado entre os anos de 1988 e 2012, as doenças do aparelho circulatório continuam como as mais prevalentes e mais mortais (Figura 1) (Ferreira, Neves, & Rodrigues, 2014).

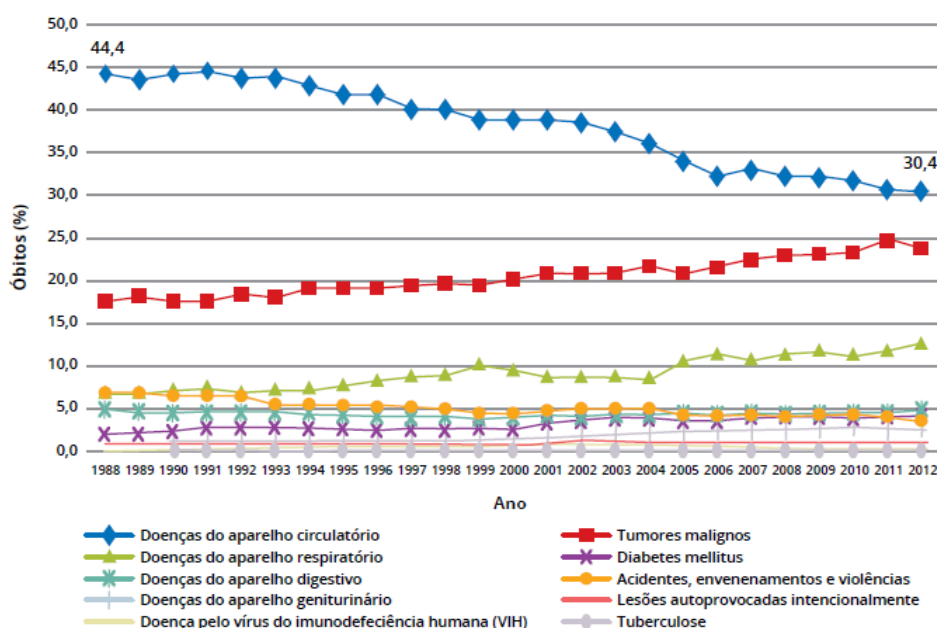


Figura 1 –Percentagem de mortes por principais causas de morte em Portugal, desde 1988 (Ferreira *et al.*, 2014).

As doenças cardiovasculares contribuem para cerca de 18% da carga global de doenças que afectam a população portuguesa com menos de 70 anos. Ou seja, é a principal causa de morte prematura no nosso país (Direcção-Geral da Saúde, 2015). Em 2012, o Programa Nacional para as Doenças Cérebro-Cardiovasculares foi actualizado e implementado com o intuito de monitorizar a evolução destas doenças em Portugal, prevenir o seu aparecimento na população e proporcionar o acesso aos cuidados necessários a todos os utentes para o seu tratamento (Direcção-Geral da Saúde, 2012).

Segundo, McGill Jr, McMahan e Gidding (2008) 90% das doenças cardiovasculares podem ser prevenidas (McGill, McMahan, & Gidding, 2008). Assim, apesar da sua elevada proporção na população mundial estas são um tipo de doença que facilmente poderá ser evitado, caso as medidas correctas sejam tomadas. A correcta prevenção das doenças cardiovasculares é de extrema importância já que é através da implementação de medidas preventivas eficazes que a sua incidência diminui. Estas medidas passam pela consciencialização da população e requerem a modificação das suas rotinas para hábitos de vida mais saudáveis, que permitam que alguns dos factores de risco destas patologias sejam diminuídos ou até mesmo evitados (Direcção-Geral da Saúde, 2012).

Assim, com este ponto de partida, em 2013 a OMS iniciou um programa, a nível mundial, cujo objectivo é a redução da prevalência das doenças crónicas, como é o caso

das doenças cardiovasculares. Nesse sentido, múltiplas medidas foram implementadas de forma a alertar as populações dos hábitos a adoptar de modo a evitar este tipo de doenças, nomeadamente: redução do sal na alimentação, diminuição do consumo de tabaco e de álcool, fazer exercício físico regular e uma dieta saudável. As medidas preventivas, de rastreio, monitorização e vigilância da população são essenciais para redução dos números alarmantes relativos às disfunções cardiovasculares, pelo que muitos países desenvolvidos têm feito esforços nesse sentido (McGill *et al.*, 2008; World Health Organization, 2011; Direcção-Geral da Saúde, 2015).

A não adopção de medidas que evitem os factores de risco considerados para as doenças cardiovasculares tem múltiplas consequências como o aumento da pressão arterial, aumento dos níveis de açúcar no sangue ou dos lípidos em circulação. De entre todos estes a pressão arterial elevada é o factor de risco considerado como mais prejudicial, contribuindo para cerca de 13% de todas as mortes relacionadas com estas patologias. Tomados em conjunto, todos estes factores provocam, consequentemente, diversas patologias como hipertensão, diabetes, dislipidemias ou obesidade, que contribuem não só para o dano dos vasos sanguíneos como para, posteriormente, o aumento da probabilidade de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, deste modo diminuindo a saúde e qualidade de vida das populações (McGill *et al.*, 2008; World Health Organization, 2011; Direcção-Geral da Saúde, 2012).

Devido à crescente importância que as doenças cardiovasculares têm vindo a obter no panorama da saúde das populações europeia e mundial, a comunidade científica tem vindo a ter um maior interesse na descoberta das suas causas. Deste modo, uma prevenção e monitorização mais eficazes deverão ser realizadas para garantir o sucesso das medidas de prevenção que têm vindo a ser implementadas. Visto que grande parte dos eventos cardiovasculares não conseguem ser descritos pelos factores de risco tradicionais, novos factores têm surgido, de entre os quais se destaca a hiperhomocisteinémia. Contudo, a verdadeira relação entre a hiperhomocisteinémia e as doenças cardiovasculares, e os mecanismos através dos quais actua, ainda não estão completamente estabelecidos (Faeh, Chiolero, & Paccaud, 2006; Steed & Tyagi, 2011).

Por conseguinte, este trabalho pretende efectuar o estudo e análise do papel da hiperhomocisteinémia nas doenças cardiovasculares elucidando para o facto de esta ser uma causa ou uma consequência das mesmas. Pretende-se, também, abordar outros temas relativos a esta temática como as causas de hiperhomocisteinémia ou os mecanismos fisiopatológicos através dos quais actua dando origem às doenças

cardiovasculares. Além disto, também os métodos desenvolvidos para o seu diagnóstico e quantificação, e as vantagens e desvantagens dos mesmos, são motivo de interesse já que ainda não foi descoberto um meio eficaz para o diagnóstico desta condição. O estudo das opções terapêuticas actualmente existentes para a redução dos seus níveis serão igualmente abordadas. Já se provou que elevados níveis de homocisteína são prejudiciais para os doentes com disfunções cardiovasculares, mas o desenvolvimento de uma terapêutica eficaz que reduzisse o risco de ocorrência destas doenças ainda não foi descoberto.

2. O Aminoácido Homocisteína

2.1. Caracterização da Homocisteína, Estrutura e suas Formas

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido que se caracteriza por conter um grupo tiol livre, também denominado por grupo sulfidril (R-SH), sendo produzida pelas células como um produto intermediário durante os ciclos da metionina e, conseqüentemente, do ácido fólico. A Hcy é sintetizada pelo organismo humano exclusivamente através da metabolização da metionina, um aminoácido essencial ao Homem. A Hcy é um aminoácido estruturalmente muito semelhante à cisteína, diferindo desta apenas por conter um grupo metil adicional, o que lhes confere propriedades semelhantes entre si (Yilmaz, 2012; Ganguly & Alam, 2015).

A homocisteína pode ser encontrada sob diversas formas no organismo humano, tal como demonstrado na Figura 2. O termo homocisteína total refere-se ao conjunto de todas as formas, livres e ligadas a proteínas, de Hcy encontradas em circulação no plasma (Perla-Kaján, Twardowski, & Jakubowski, 2007). Deste modo, das diversas formas de homocisteína, cerca de 70 a 80% circulam associadas a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina (proteína-Hcy-S-S-Hcy). Ao passo que apenas cerca de 1% circula sob a forma livre, ou seja, sem ligação a nenhuma proteína (cerca de 20 a 30%) (Ganguly & Alam, 2015). A homocisteína livre pode encontra-se na forma reduzida ou oxidada, sendo as formas oxidadas mais prevalentes. Na forma oxidada a Hcy origina dissulfetos de Hcy (Hcy-S-S-Hcy) ou cisteína-Hcy (Cys-S-S-Hcy). Apenas cerca de 2% da Hcy livre está em circulação na forma reduzida.

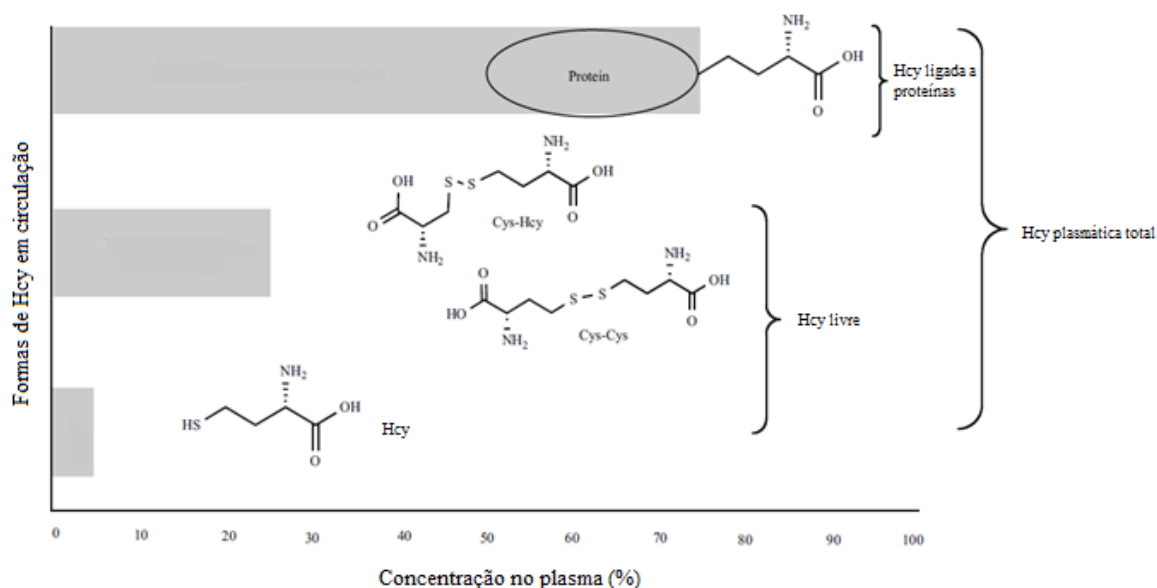


Figura 2 - Diferentes formas de homocisteína em circulação no sangue (adaptado de Christopher *et al.*, 2007).

Apesar de a Hcy ter sido descoberta no de 1932 a verdadeira importância deste aminoácido só começou a ser realmente conhecida na década de 50 (Yilmaz, 2012). A partir desta data a Hcy começou a estabelecer-se como um novo factor de risco para diversas patologias, sendo a sua ligação às doenças cardiovasculares aquela que tem despertado cada vez mais o interesse da comunidade científica. Note-se que apenas cerca 50% das disfunções cardiovasculares conseguem ser explicadas pelos factores de risco tradicionais, como tabaco, pressão arterial elevada, níveis de açúcar ou de lípidos elevados em circulação. Assim novos factores de risco têm surgido, dos quais se destaca a hiperhomocisteinémia (Faeh, Chiolo, & Paccaud, 2006; Steed & Tyagi, 2011).

2.2. Metabolismo da Homocisteína

A homocisteína é um aminoácido formado a partir da metionina e cujo metabolismo envolve dois processos evidenciados na Figura 3 a): a remetilação e a transulfuração. A metabolização da Hcy é feita pela via de transulfuração quando existe excesso de metionina no organismo, ao passo que a via de remetilação é usada quando os níveis de metionina são baixos (Wierzbicki, 2007).

Após as refeições, a metionina é libertada no sistema digestivo e transportada para os diferentes órgãos do organismo, sendo aí captada pelas células.

Intracelularmente começa, então, o ciclo da metionina e, consequentemente, o ciclo da homocisteína (Jakubowski, 2006).

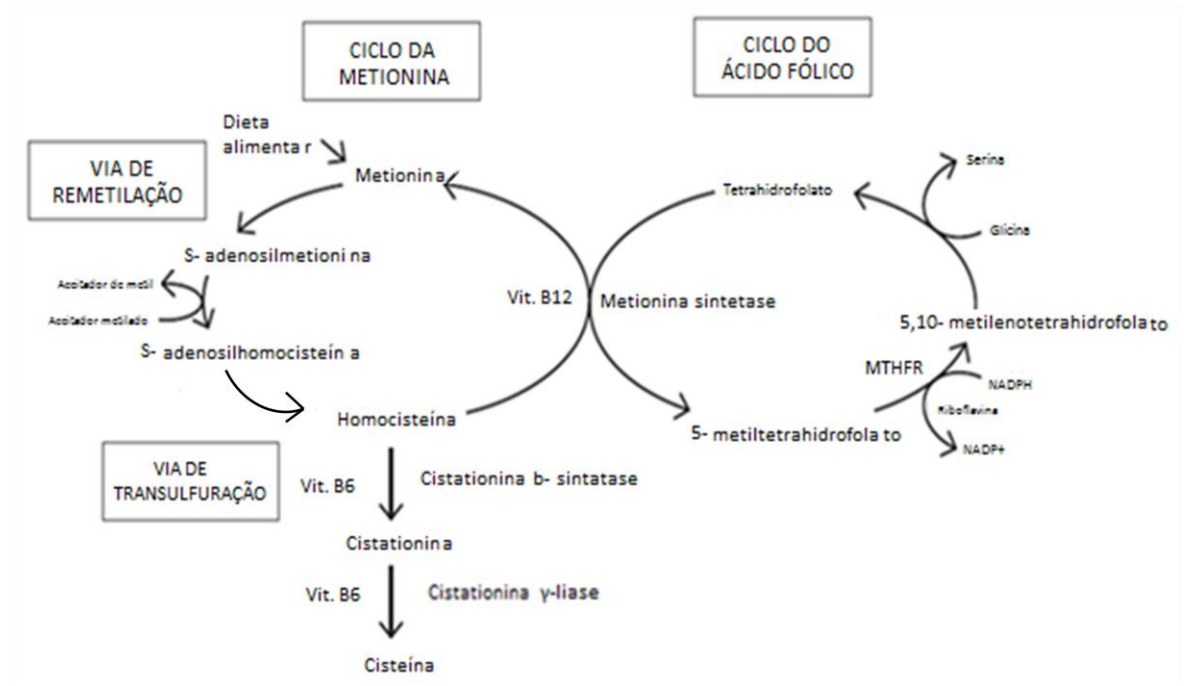
A via de remetilação envolve a remoção do grupo metil da metionina e a subsequente formação de S-adenosilmetionina (SAM), o maior dador de grupos metil do corpo humano. A SAM é convertida em S-adenosilhomocisteína (SAH), e depois hidrolisada a Hcy por acção da SAH hidrolase. Esta conversão é uma reacção de extrema importância já que é a única fonte conhecida de Hcy no organismo humano (Jakubowski, 2008). É, também, uma reacção reversível cujo equilíbrio termodinâmico beneficia a síntese de SAH, em detrimento da hidrólise em Hcy. A relação SAM/SAH é essencial já que define o potencial de metilação celular (S. Zhou, Zhang, & Xu, 2014).

Posteriormente, a Hcy formada é de novo remetilada em metionina por adição de um grupo metil fornecido pelo 5-metiltetrahidrofolato, usando a enzima metionina sintetase (MS) e, como co-factor, a vitamina B₁₂. Um dos produtos da reacção com a MS é o tetrahidrofolato, que é convertido em 5-metiltetrahidrofolato e, posteriormente, a 5,10-metilenotetrahidrofolato, por acção da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (S. Zhou *et al.*, 2014).

A via de remetilação da Hcy pode ocorrer por vias alternativas, como demonstrado na Figura 3 b), muito embora a sua importância não esteja completamente estabelecida. Assim, a betaína pode actuar como um dador de metil alternativo, aquando da conversão de Hcy em metionina, sendo esta reacção catalisada por outra enzima dependente da vitamina B₁₂, a betaína-homocisteína metiltransferase (Herrmann, Herrmann, & Obeid, 2007).

Relativamente à via de transulfuração, a Hcy é metabolizada a cistationa por acção da enzima cistationina β -sintetase (CBS) e da vitamina B₆. Seguidamente a cistationa é transformada em cisteína, através da enzima cistationina γ -liase e do co-factor vitamina B₆ (S. Zhou *et al.*, 2014). O excesso de cisteína é então oxidado a sulfato ou eliminado do organismo pela urina (Wierzbicki, 2007). Esta via apenas está presente em alguns órgãos, tais como fígado, rins, pâncreas e intestino delgado (Perla-Kaján *et al.*, 2007).

a)



b)

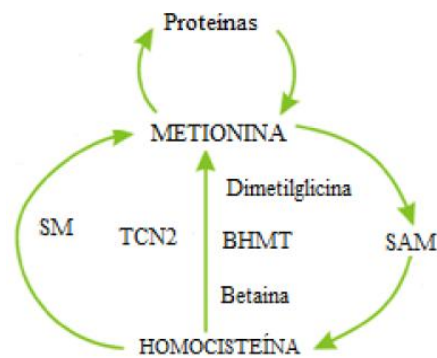


Figura 3 a) - Metabolismo da homocisteína, via de remetilação e via de transulfuração (adaptado de Cardoso, 2009)

b) Metabolismo da homocisteína, via de remetilação alternativa (adaptado de Brustolin et al., 2010).

Devido à grande semelhança entre a homocisteína e a metionina, a Hcy pode entrar na síntese proteica. Isto deve-se ao resultado de um erro em que a Hcy é activada no lugar da metionina, pela metionil-tRNA sintetase, dando origem a um metabolito muito reactivo, a homocisteína-tiolactona (Hcy-TI) (Perla-Kaján *et al.*, 2007). Com esta transformação inicia-se um processo denominado N-homocisteinilização. Uma vez formada, a Hcy-TI reage com as proteínas celulares ligando-se a grupos ε-amino de resíduos de lisina. Este processo provoca modificações na estrutura das proteínas,

levando à perda da sua função e ao desencadeamento de uma resposta autoimune por parte das N-Hcy-proteínas formadas e, por consequência, ao aumento da inflamação vascular. Assim, este processo provoca danos na normal conformação das proteínas celulares, podendo desencadear o desenvolvimento de aterosclerose e, mais tarde, de múltiplas patologias cardiovasculares (Garel & Tawfik, 2006; Perla-kaja & Jakubowski, 2012; Yilmaz, 2012).

Por outro lado, a Hcy-TI pode ser eliminada do organismo através da sua hidrólise, por acção da enzima paraoxonase 1 (PON 1). Indo assim impedir a acumulação de N-Hcy-proteínas (produtos da N-homocisteinilização) nas células endoteliais. Dado que a actividade da enzima PON 1 está diminuída em condições de hiperhomocisteinémia, e as concentrações de Hcy-TI e N-Hcy-proteínas estarem aumentadas nestas circunstâncias, estes são factores a ter em consideração na prevenção da ocorrência de eventos cardiovasculares (Garel & Tawfik, 2006; Perla-kaja & Jakubowski, 2012; Yilmaz, 2012). Os processos através dos quais a Hcy se relaciona com a Hcy-TI, N-Hcy-proteínas e a enzima PON 1 no desenvolvimento de doenças cardiovasculares será discutido com maior pormenor adiante, no subcapítulo 3.3.: “Hiperhomocisteinémia e Doenças Cardiovasculares”.

3. Hiperhomocisteinémia

3.1. Classificação da Hiperhomocisteinémia

A Hcy foi primeiramente sintetizada *in vitro* em 1932 por Butz e du Vigneaud (Steed & Tyagi, 2011). No entanto, só anos mais tarde, em 1962, foram relatados os primeiros casos de homocistinúria, doença causada por mutações nas enzimas participantes no metabolismo da homocisteína, e que aumenta exponencialmente o risco de lesões cardiovasculares prematuras devido aos níveis extremos de homocisteína pelos quais se caracteriza. No ano de 1969 McCully propôs a relação entre os elevados níveis de homocisteína e o aumento do risco de doenças cardiovasculares, em doentes portadores de homocistinúria (Jakubowski, 2006; Ntaios, 2015). No seguimento deste trabalho, em 1976, Wilcken e Wilcken, foram os primeiros a provar a relação entre a hiperhomocisteinémia e as disfunções no metabolismo da metionina, apresentadas por pacientes com doença arterial coronária, quando comparados a indivíduos saudáveis (Faeh *et al.*, 2006). Foi demonstrado que a concentração do dissulfeto homocisteína-cisteína era maior em doentes que padeciam de doença arterial coronária, quando comparada à concentração do mesmo nos controlos. Desta forma, propuseram que a Hcy desempenhasse um papel relevante na génese da doença arterial coronária prematura. Com efeito, estima-se que cerca de 10% dos casos de doença arterial coronária possam ter como causa a hiperhomocisteinémia (J. Zhou & Austin, 2009). Entretanto, apenas em 1978 foi detectada pela primeira vez, a presença de homocisteína em indivíduos saudáveis (Vannucchi & Melo, 2009). Nestes, e em jejum, os níveis normais de Hcy definem-se entre 5-15 $\mu\text{mol/L}$ (Perla-Kaján *et al.*, 2007).

Segundo Ganguly e Alam (2015) a hiperhomocisteinémia é uma condição “caracterizada por níveis anormalmente altos de homocisteína (acima de 15 $\mu\text{mol/L}$) no sangue”. Estima-se que a hiperhomocisteinémia está presente, aproximadamente, em 5% da população em geral, e está intimamente relacionada com o aumento do risco de desenvolvimento de várias patologias como é o caso das doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes, diabetes mellitus, osteoporose, entre outras (S. Zhou *et al.*, 2014).

Segundo os níveis de Hcy encontrados no sangue, a hiperhomocisteinémia pode classificar-se como ligeira, moderada e severa, as quais correspondem a concentrações plasmáticas de Hcy entre 15-30 $\mu\text{mol/L}$, 31-100 $\mu\text{mol/L}$ e superior a 100 $\mu\text{mol/L}$,

respectivamente. Normalmente, os indivíduos com hiperhomocisteinémia ligeira sofrem de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e doenças vasculares periféricas. Quanto aos indivíduos com hiperhomocisteinémia moderada, sofrem maioritariamente de doenças do foro renal. Já a hiperhomocisteinémia severa, resulta de mutações em enzimas do metabolismo da Hcy originando homocistinúria e tem como principais manifestações clínicas a aterosclerose, atraso mental e anomalias esqueléticas (Herrmann *et al.*, 2007; Perla-Kaján *et al.*, 2007).

3.2. Etiologia da Hiperhomocisteinémia

A hiperhomocisteinémia é uma condição que está intimamente relacionada com a presença precoce de doenças cardiovasculares, entre outras patologias, e tem uma variedade de factores como causa, dos quais se destacam os apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 - Factores predisponentes da hiperhomocisteinémia (adaptado de Zhou *et al.*, 2014).

Defeitos Genéticos	Deficiências Nutricionais	Outros factores
Mutações na enzima CBS	Falta de ácido fólico	Idade
Mutações na enzima MTHFR	Falta de vitamina B ₆	Género feminino / masculino
Defeitos genéticos no metabolismo da vit. B ₁₂	Falta de vitamina B ₁₂	Estilo de vida (tabaco, café, álcool)
		Insuficiência renal crónica
		Disfunção hepática
		Diabetes mellitus

3.2.1. Factores Genéticos

Os factores genéticos mais frequentes que dão origem à hiperhomocisteinémia relacionam-se com mutações nos genes CBS e MTHFR. Estas são alterações raras, na população em geral, e apenas apresentam manifestações clínicas quando em homozigotia (Silva *et al.*, 2010).

Tal como referido anteriormente, a causa mais frequentemente associada a hiperhomocisteinémia severa prende-se com defeitos no gene que codifica a enzima CBS. Este defeito dá origem a uma patologia de transmissão autossómica recessiva, denominada homocistinúria. Esta caracteriza-se por apresentar níveis de Hcy até 40 vezes mais elevados, quando comparados com sujeitos saudáveis (Christopher *et al.*,

2007; Pezzini, Del Zotto, & Padovani, 2007). Ou seja, quando a hiperhomocisteinémia severa se apresenta como uma patologia clínica passa a definir-se como homocistinúria. Esta é uma doença que se manifesta por danos neurológicos, complicações oculares, atraso mental, deformações ósseas, aterosclerose, convulsões e eventos vasculares em idade prematura (Herrmann *et al.*, 2007; Pezzini *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010). Os doentes que padecem desta patologia, frequentemente, acabam por falecer devido a tromboembolismos, sendo a sua taxa de sobrevivência bastante baixa após os trinta anos de idade (Herrmann *et al.*, 2007).

Outra das causas que está na origem de hiperhomocisteinémia grave é uma deficiência na enzima MTHFR, enzima usada na via de remetilação do metabolismo da Hcy e que apresenta dois polimorfismos funcionais. O polimorfismo mais frequente na população é a mutação C677T e provoca uma alteração da termolabilidade da enzima (em estado homozigótico) que, por sua vez, conduz a perda parcial de actividade enzimática e ao aumento dos níveis de folato (Brustolin, Giugliani, & Félix, 2010; Ciaccio & Bellia, 2010). Esta variante refere-se a uma mutação no nucleótido 677 com substituição de citosina por timina. Os indivíduos com genótipo 677TT apresentam aproximadamente 30% de actividade da enzima MTHFR, quando comparados com aqueles com genótipo 677CC, ao passo que os com genótipo 677CT apresentam 65% de actividade enzimática (Brustolin *et al.*, 2010). A mutação C677T é bastante comum na população mundial, tendo uma prevalência de 30% em europeus e japoneses e cerca de 11% em africanos e americanos (Ciaccio, Bivona, & Bellia, 2008).

Outro dos polimorfismos associados à enzima MTHFR refere-se à mutação A1298C, que dita a substituição de adenina por citosina no nucleótido 1298. Mesmo sem promover qualquer alteração na termolabilidade enzimática, quando em heterozigotia, esta mutação provoca uma redução em cerca de 35% da actividade da enzima MTHFR (Ganguly & Alam, 2015). No entanto, este polimorfismo não está associado a quaisquer alteração dos níveis sanguíneos de folato (Brustolin *et al.*, 2010).

3.2.2. Factores Nutricionais

As alterações nutricionais são aquelas que mais têm contribuído para o aumento de Hcy, provocando hiperhomocisteinémia moderada. Variações nos níveis séricos de ácido fólico e de vitaminas B₆ e B₁₂, usados no metabolismo de Hcy como co-factores enzimáticos, são as principais causas que contribuem para as modificações nutricionais

verificadas em casos de hiperhomocisteinémia (Christopher *et al.*, 2007; Ciaccio *et al.*, 2008). Com efeito, existe uma relação inversa entre os níveis de ácido fólico e Hcy encontrados no sangue. Isto pode ser explicado através do ciclo da homocisteína em que, a via de desmetilação do metabolismo da Hcy depende do ciclo do ácido fólico, assim uma diminuição dos níveis de folato provocam uma redução da capacidade remetilação da Hcy, elevando os seus níveis plasmáticos (Figura 3 a)) (Ciaccio *et al.*, 2008).

A escassez de folato e vitaminas do B₆ e B₁₂ pode ainda ser influenciada por outros factores como a dieta, a idade, a gravidez, o alcoolismo ou o uso de determinados fármacos (Ciaccio & Bellia, 2010).

3.2.3. Factores Fisiológicos

Além dos factores supracitados existem ainda outros factores, como os fisiológicos, que contribuem para o aumento da Hcy em circulação, e dos quais se destacam o género e a idade (Pezzini *et al.*, 2007). Sabe-se que o género é determinante para os níveis de Hcy, sendo que o sexo masculino apresenta níveis mais elevados de Hcy basal quando comparado ao sexo feminino (cerca de 2 µmol/L). Mesmo na menopausa, em que a concentração de estrogénios está diminuída, e os níveis de Hcy aumentam, serão sempre os homens a apresentar níveis mais elevados de Hcy, possivelmente devido à maior massa muscular que apresentam (Christopher *et al.*, 2007; Herrmann *et al.*, 2007).

Outro dos factores relevantes prende-se com a idade. As crianças apresentam valores de Hcy basal mais baixos quando comparados com os adolescentes e adultos, isto porque os níveis de Hcy vão aumentando ao longo da vida dos indivíduos. Neste campo, os idosos não são excepção já que com o avançar da idade, o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares é maior, isto deve-se não só às alterações hormonais, como também a uma maior carência vitamínica própria de idade avançada, o que leva a níveis de Hcy aumentados (Christopher *et al.*, 2007; Herrmann *et al.*, 2007).

3.2.4. Outros Factores

Outros factores, como tabaco, álcool, café, algumas doenças coadjuvantes ou o uso de determinados fármacos, podem alterar os níveis normais de Hcy e provocar hiperhomocisteinémia.

Das várias doenças que interferem com os níveis de Hcy destacam-se a insuficiência renal e hepática, no entanto, outras patologias como o hipotireoidismo, a psoríase, a anemia perniciosa ou o cancro podem ter um efeito semelhante (Pezzini *et al.*, 2007). Doentes diagnosticados com leucemia e psoríase apresentam níveis de Hcy elevados, provavelmente devido à elevada taxa de proliferação celular característica destas patologias (Pezzini *et al.*, 2007).

Uma função renal comprometida pode, também, levar a um aumento consistente dos níveis de Hcy. Assim, doentes com insuficiência renal têm elevados níveis de Hcy visto que existe um prejuízo na depuração desta, pelas alterações que esta patologia provoca no metabolismo da Hcy (Ciaccio *et al.*, 2008).

As modificações nos níveis normais de homocisteinémia ocorrem, também, em pacientes com disfunção hepática, visto que o fígado é outros dos órgãos participantes no metabolismo da Hcy. Nestas situações, há uma perturbação no metabolismo da metionina, provocando uma diminuição da concentração de SAM, que por sua vez causa um aumento da concentração de SAH e, consequentemente, uma redução da relação SAM/SAH. Assim, há um decréscimo de glutatona em circulação, o aumento da peroxidação lipídica e, por fim, danos hepáticos (Blasco *et al.*, 2005).

Também o álcool participa como mediador indirecto na hiperhomocisteinémia, pois provoca danos hepáticos que levam, posteriormente, ao aumento da Hcy. Os mecanismos pelos quais actua ainda não estão completamente estabelecidos. Contudo, a ingestão de álcool pode levar a uma carência vitamínica que provocará um aumento de Hcy (Blasco *et al.*, 2005; Christopher *et al.*, 2007).

Além do álcool, o tabaco pode ser outra das causas de hiperhomocisteinémia, apesar de o mecanismo através do qual actua ainda não estar totalmente esclarecido. Ainda assim, pensa-se que este possa estar relacionado com a inibição da enzima MS ou com a carência das vitaminas B₆, B₉ e B₁₂ (Christopher *et al.*, 2007).

Outro dos factores que, igualmente, leva à alteração dos níveis de Hcy é o consumo de cafeína. Segundo Pezzini, Del Zotto e Padovani (2007) foi observada uma relação entre o número de cafés ingeridos e os níveis de Hcy, verificando-se que um

consumo de mais de seis cafés por dia aumenta os níveis de homocisteína em 2 a 3 $\mu\text{mol/L}$ (Pezzini *et al.*, 2007).

Além de todos factores acima mencionados podem ainda destacar-se algumas terapêuticas que contribuem para o aumento dos níveis de Hcy, nomeadamente: antiepiléticos, metformina, omeprazol, levodopa, ciclosporina, isoniazida e contraceptivos, entre outros (Herrmann *et al.*, 2007; Pezzini *et al.*, 2007).

3.3. Hiperhomocisteinémia e Doenças Cardiovasculares

Apesar dos múltiplos esforços feitos nas últimas décadas no sentido da prevenção e combate às doenças cardiovasculares, estas ainda continuam a ter grande relevância e impacto a nível mundial, representando perto de 30% de todas as mortes em todo o mundo (Mendis *et al.*, 2011). As doenças cardiovasculares são caracterizadas por uma disfunção no normal funcionamento do coração, artérias e veias, tendo como principais causas múltiplos factores, designadamente: história familiar, idade, sexo, consumo de tabaco, pressão arterial elevada, níveis elevados de glucose, obesidade, entre outros. (Steed & Tyagi, 2011).

No entanto, apesar de grande parte dos acidentes cardiovasculares poderem ser explicados pelos factores de risco clássicos, cerca de 50% dos eventos cardiovasculares podem ser atribuídos a potenciais novos factores de risco (Faeh, Chiolerio, & Paccaud, 2006; Steed & Tyagi, 2011). Note-se que a Escala de Risco Cardiovascular de Framingham, um dos principais e mais importantes instrumentos usados pelos profissionais de saúde para previsão da ocorrência de doenças cardiovasculares, estima abaixo do valor real o risco cardiovascular em doentes com elevados níveis de homocisteína (Ganguly & Alam, 2015). Deste modo, um novo paradigma quanto às causas deste tipo de doenças tem sido discutido ao longo das últimas décadas, sendo ainda necessário percorrer um longo caminho para a total compreensão das mesmas.

Segundo diversos estudos, determinou-se que uma redução de cerca de 3 $\mu\text{mol/L}$ na concentração plasmática de Hcy diminui o risco de enfarte agudo do miocárdio e de acidente vascular cerebral (AVC) em 15% e 24%, respectivamente. Por outro lado, deduziu-se também, que o risco de desenvolvimento de doença arterial coronária aumenta em cerca de 20% aquando as concentrações plasmáticas de Hcy se apresentam cerca de 5 $\mu\text{mol/L}$ acima do normal (Debreceeni & Debreceeni, 2014). Esta relação foi

inicialmente proposta por McCully, no ano de 1969, através da observação das lesões apresentadas por doentes que sofriam de homocistinúria e a correlação com o facto de estes morrerem precocemente por complicações advindas de doenças cardiovasculares (J. Zhou & Austin, 2009; Ntaios, 2015). Actualmente, sabe-se que quando não recebem tratamento adequado, os doentes afectados por esta patologia apresentam 50% de risco de apresentar lesões vasculares prematuras antes dos trinta anos (Lentz, 2005). As lesões estudadas nestes pacientes por McCully consistem em diversas anomalias patológicas, nomeadamente, a acumulação de placas fibrosas, a anormal formação de trombos e a perturbação da normal constituição da lâmina elástica interna dos vasos, levando a um acréscimo do risco da sua oclusão. Estas alterações são mais prevalentes em vasos sanguíneos de menor calibre, comparativamente aos vasos de grande calibre (Lentz, 2005; Pezzini *et al.*, 2007).

Com vista ao desenvolvimento e à compreensão desta relação entre a Hcy e as doenças cardiovasculares vários estudos retrospectivos e prospectivos foram realizados ao longo de várias décadas. O objectivo destes estudos foi demonstrar a possibilidade de a hiperhomocisteinémia ser um factor de risco para patologias como enfarte do miocárdio, doenças cerebrovasculares e tromboembolismo venoso (Wierzbicki, 2007). No entanto, os resultados apresentados por estes estudos não foram consensuais pelo que foi necessário o desenvolvimento de ensaios clínicos que facilitassem a compreensão do papel da hiperhomocisteinémia como uma causa ou como um marcador para as doenças cardiovasculares (Ciaccio *et al.*, 2008; Ciaccio & Bellia, 2010). Os ensaios clínicos desenvolvidos, as suas características e os seus resultados será um assunto discutido com maior pormenor adiante no capítulo 5: “Perspectivas de Tratamento da Hiperhomocisteinémia”.

No caso dos estudos retrospectivos (com homocisteína a ser medida antes do evento cardiovascular), o risco associado à hiperhomocisteinémia foi maior e mais significativo, ao passo que nos estudos prospectivos (com homocisteína a ser medida após o evento cardiovascular) os resultados obtidos não foram significativos pelo que esta associação não foi tão relevante (Wierzbicki, 2007; Ciaccio *et al.*, 2008; Ciaccio & Bellia, 2010). Assim, e visto que os resultados dos diversos estudos são contraditórios, os investigadores continuaram a pesquisar novos métodos que correlacionem estes dois factores. Deste modo, continua em aberto a hipótese de a hiperhomocisteinémia ser uma causa ou apenas um marcador para as doenças cardiovasculares (Ciaccio *et al.*, 2008; Ciaccio & Bellia, 2010).

Apesar dos resultados inconsistentes e de ainda não se entender completamente o papel da Hcy nas doenças cardiovasculares a hiperhomocisteinémia foi reconhecida, pela primeira vez, como um factor de risco para aterosclerose e doenças de coagulação na década de 90 (Ganguly & Alam, 2015). Deste modo, e de acordo com recomendações europeias para a prevenção da doença cardiovascular na prática clínica do ano de 2012, a homocisteína revela-se como um marcador de segunda linha na avaliação do risco e na prevenção deste tipo de patologias (Perk *et al.*, 2012).

3.3.1. Mecanismos de Lesão Vascular da Hiperhomocisteinémia

Os mecanismos através dos quais a hiperhomocisteinémia dá origem e promove o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ainda não estão completamente estabelecidos, pelo que várias hipóteses têm sido sugeridas pelos investigadores. Através dos mecanismos representados na Figura 4, compreendemos que a hiperhomocisteinémia provoca disfunção endotelial, activação de leucócitos e de plaquetas em circulação, diminuição da capacidade de vasodilatação vascular, estimulação das células do músculo liso vascular, entre outros, estimulando a progressão da aterosclerose e a formação de trombos (Weiss, Keller, Hoffmann, & Loscalzo, 2002).

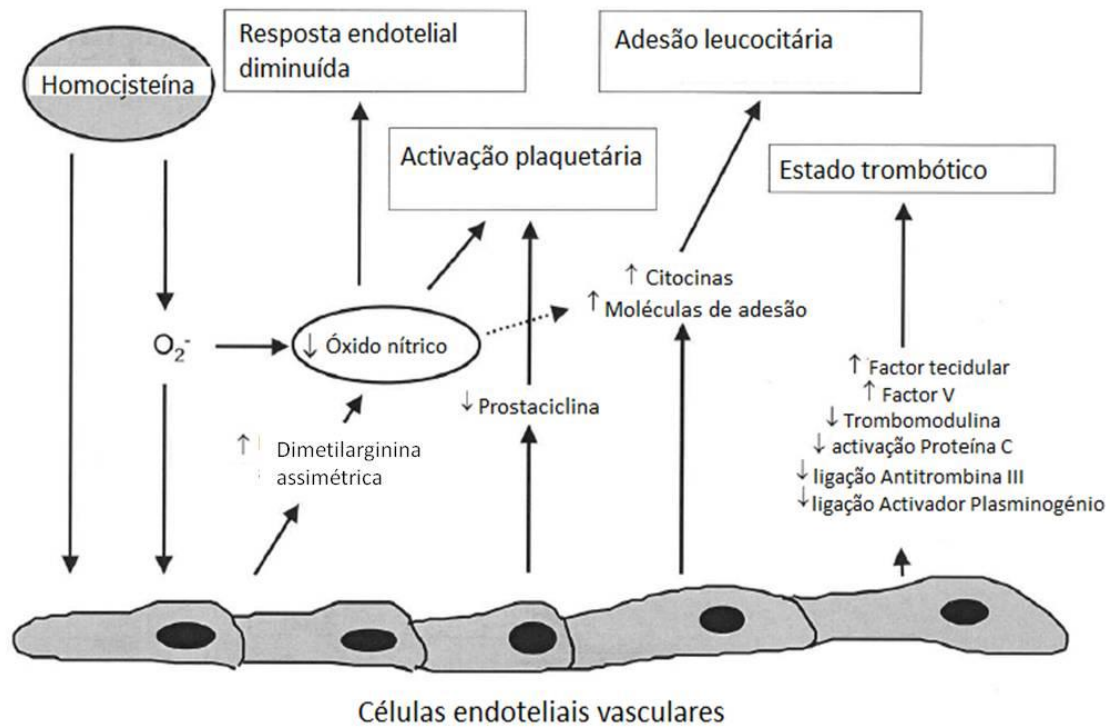


Figura 4 - Mecanismos de lesão da homocisteinémia nas doenças cardiovasculares (adaptado de Weiss *et al.*, 2002). A Hcy diminui a disponibilidade de NO no endotélio, o que leva à perturbação da vasodilatação endotelial. A menor disponibilidade de NO pode ser causada pelas espécies ROS, por inibição das enzimas antioxidantes ou por aumento dos níveis de dimetilarginina assimétrica. A Hcy induz a expressão de citocinas e moléculas de adesão e, consequentemente, promove a adesão leucocitária. A Hcy promove, também, um estado trombótico por activação de diversos mecanismos pré-trombóticos como activação do factor V, do factor tecidual, entre outros.

A aterosclerose e a Hiperhomocisteinémia

A aterosclerose é considerada como o processo patológico que maior relevância tem para o início e desenvolvimento das doenças cardiovasculares, incluindo enfarte agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca ou AVC (Mangge *et al.*, 2014; Ganguly & Alam, 2015).

As lesões ateroscleróticas iniciam-se por um anormal funcionamento das células endoteliais, conduzindo à sua lesão e, consequentemente, à acumulação de monócitos e lípidos na parede dos vasos sanguíneos (Esper *et al.*, 2006). Também, o desencadeamento de uma resposta inflamatória por parte do sistema imunitário é um dos passos fundamentais no desenvolvimento da aterosclerose. Sendo que a

aterosclerose se caracteriza por ser um estado inflamatório crónico (J. Zhou & Austin, 2009).

Assim, ocorre a migração dos monócitos em circulação e a sua adesão ao endotélio vascular, sendo que estes atravessam o endotélio até à camada íntima do vaso, diferenciando-se em macrófagos. Com o desenvolvimento das lesões vasculares, os macrófagos oxidam as lipoproteínas acumuladas, produzindo espessamentos, distribuídos irregularmente na parede vascular, os quais se denominam células espumosas. Estas células caracterizam-se por apresentarem um núcleo lipídico que, com a progressão da patologia, vai aumentando. Também o número e tamanho destas células vai crescendo proporcionalmente, originando a formação de placas de ateroma (J. Zhou & Austin, 2009; Guyton & Hall, 2011). Com o avanço da aterosclerose, as artérias afectadas tornam-se cada vez menos elásticas e mais estreitas. Mais tarde, dá-se a precipitação de cálcio e colesterol, levando à formação de calcificações que enrijecem as artérias e levando à perda da distensibilidade que lhes é característica. As calcificações formadas facilmente se rompem, fazendo com que o ateroma derrame o seu conteúdo na corrente sanguínea, formando coágulos, que mais tarde poderão levar à formação de trombos e à oclusão dos vasos sanguíneos (J. Zhou & Austin, 2009; Guyton & Hall, 2011).

Concluindo, a formação de células espumosas e deposição de lípidos extracelulares, a infiltração de células inflamatórias no espaço celular e a apoptose celular são considerados os passos fundamentais para a progressão das lesões ateroscleróticas, tal como representado na Figura 5 (Mangge *et al.*, 2014).

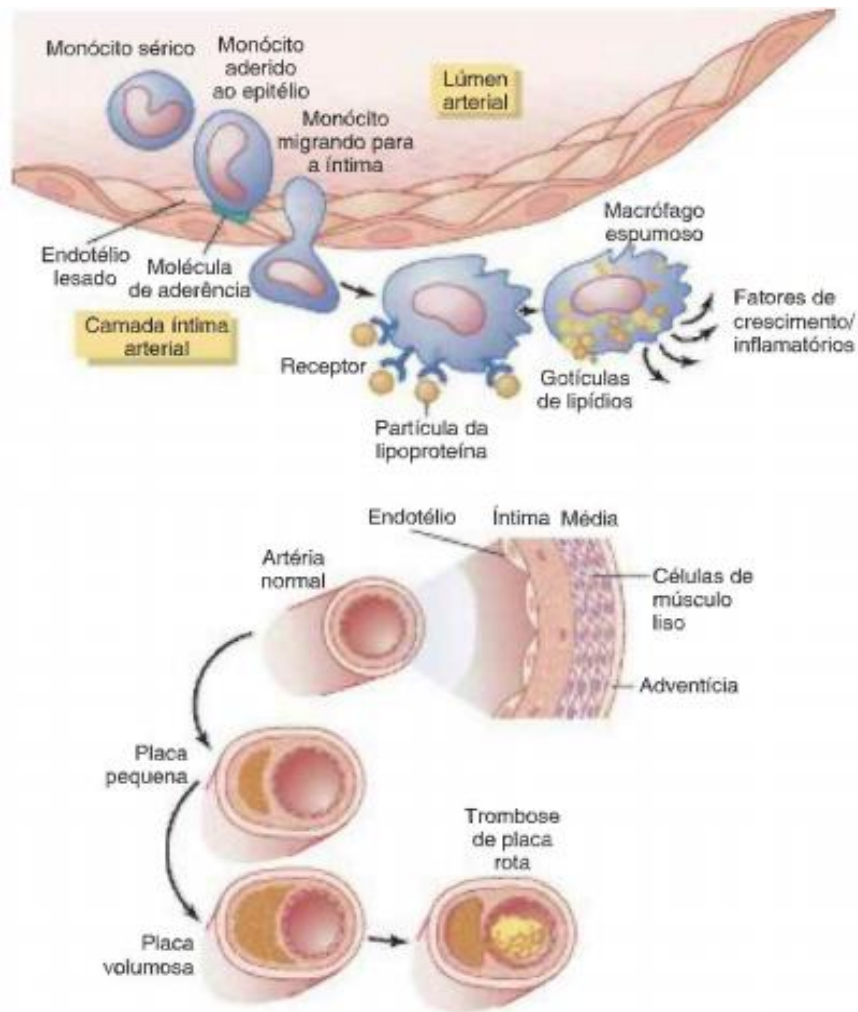


Figura 5 - Progressão da lesão aterosclerótica (retirado de Guyton & Hall, 2011).

Stress Oxidativo e Disfunção Endotelial

O endotélio define-se como a camada intracelular dos vasos sanguíneos, detendo uma grande importância, uma vez que tem a capacidade de detectar alterações da homeostase celular, agindo de acordo com a sua preservação (Esper *et al.*, 2006). Assim, este apresenta como principais funções a regulação do fluxo sanguíneo e da coagulação, a ativação plaquetária e a adesão dos leucócitos. Deste modo, uma desregulação no normal funcionamento endotelial provoca um deficiente relaxamento vascular, característica comum a muitas doenças cardiovasculares (Lentz, 2005). Uma atividade vasomotora endotelial prejudicada é um marcador que permite antever o desenvolvimento de doença arterial coronária, pelo que este é um factor de extrema importância e a ter em consideração na prevenção de patologias cardiovasculares (Weiss *et al.*, 2002).

A disfunção endotelial é um dos factores indicativos da diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador vascular, sendo este um dos mecanismos através dos quais a hiperhomocisteinémia induz um comprometimento no normal funcionamento vasomotor. O NO é produzido através da enzima sintetase do óxido nítrico (eNOS), como resposta a estímulos fisiológicos externos, atravessando a parede vascular e provocando o relaxamento dos vasos sanguíneos e, por conseguinte, a sua vasodilatação (Esper *et al.*, 2006; Christopher *et al.*, 2007).

Quando a Hcy é adicionada ao plasma o seu grupo tiol livre é auto-oxidado dando origem a espécies reactivas de oxigénio (ROS). Estas promovem e originam diversas lesões celulares, nomeadamente por inactivação de NO, que posteriormente resulta no desenvolvimento e progressão de aterosclerose. Sob condições fisiológicas normais, estas espécies são habitualmente produzidas nas células sendo reguladas por um sistema de moléculas antioxidantes que as neutralizam, evitando assim que o stress oxidativo por elas causado seja prejudicial à integridade do endotélio. No entanto, a hiperhomocisteinémia promove a desregulação deste sistema (Esper *et al.*, 2006; Yilmaz, 2012). De entre as ROS que despoletam esta reacção destacam-se: o anião superóxido, o peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo (Weiss *et al.*, 2002; Mangge *et al.*, 2014).

Por aumento da concentração de ROS, a Hcy provoca lesões no endotélio ao inibir o funcionamento das enzimas envolvidas no sistema antioxidante celular, como o caso da glutathione peroxidase 1 (Gpx-1) (Weiss *et al.*, 2002; Pezzini *et al.*, 2007). Descobriu-se que ratos homozigóticos, com deficiência desta enzima, apresentam disfunções no normal relaxamento do endotélio, sendo a severidade deste distúrbio aumentada na presença de hiperhomocisteinémia, induzida através da dieta. Este estudo demonstra que as enzimas antioxidantes, nomeadamente a enzima Gpx-1, diminuem a disponibilidade de NO o que aumenta a sensibilidade das células aos efeitos tóxicos das ROS. Assim sendo, estas enzimas têm um efeito protector celular (Wang *et al.*, 2005; Yilmaz, 2012).

Tal como descrito anteriormente, a Hcy provoca disfunção endotelial por redução da disponibilidade de NO. Deste modo, o risco de trombose e aterosclerose acresce pois o decréscimo de NO disponível provoca a inibição tanto da agregação plaquetária como da adesão dos leucócitos ao endotélio (Wang *et al.*, 2005; J. Zhou & Austin, 2009). Posto isto, a diminuição de NO leva ao aumento da expressão tanto de

citocinas como do inibidor do activador de plasminogénio, o que promove um maior risco de desenvolvimento de coágulos e, portanto, uma maior predisposição ao desenvolvimento de trombose (Debreceni & Debreceni, 2014).

Outro dos mecanismos propostos para a disfunção celular provocada pela homocisteína, através da promoção de stress oxidativo celular, é o aumento da produção intracelular do anião superóxido, provocando o anormal relaxamento vascular. Este anião reage com NO, levando à sua inactivação e produzindo o anião peroxinitrito, um isómero instável do nitrato muito reactivo e com potente poder oxidante que gera vasodilatação vascular anormal, efeito que está na origem de diversas patologias cardiovasculares (Lentz, 2005; J. Zhou & Austin, 2009).

A hiperhomocisteinémia provoca não só stress oxidativo celular como pode também levar à oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), induzindo a degradação do endotélio vascular, um dos eventos que preconiza o início da aterosclerose. O colesterol LDL normalmente em circulação no organismo é inócuo e não provoca qualquer tipo de inflamação vascular. Contudo, ao ser oxidado passa a agredir o endotélio, aumentando a actividade de moléculas pró-inflamatórias e factores de crescimento (Weiss *et al.*, 2002; Esper *et al.*, 2006). Não obstante, esta hipótese falha ao não ser capaz de justificar o facto de a cisteína, um aminoácido estruturalmente semelhante à homocisteína, ter maior predisposição à auto-oxidação e não provocar quaisquer danos no endotélio vascular (Christopher *et al.*, 2007).

Por fim, constatou-se que doentes com hiperhomocisteinémia apresentarem elevados níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA), um conhecido inibidor de NO. O aumento dos níveis de ADMA pode ser um factor de risco cardiovascular em pacientes com hiperhomocisteinémia, hipercolesterolémia, diabetes e hipertensão. O mecanismo passa por inibir a eNOS e consequentemente a produção de NO, contribuindo então para o aumento do stress oxidativo celular (Weiss *et al.*, 2002; Lentz, 2005; J. Zhou & Austin, 2009). Adicionalmente, correlacionou-se a concentração plasmática de ADMA com a diminuição do relaxamento muscular em macacos com hiperhomocisteinémia, causada por uma dieta rica em metionina e pobre em folatos. A elevada concentração de ADMA em doentes com hiperhomocisteinémia poderá estar relacionada com um decréscimo do seu metabolismo, visto que há uma inibição da enzima dimetilarginina dimetilamino hidrolase (DDAH), responsável pela hidrólise da ADMA (Lentz, 2005; Christopher *et al.*, 2007).

Inflamação

A disfunção endotelial, provocada por níveis elevados de Hcy, pode levar ao aumento da expressão de citocinas e de moléculas responsáveis pela adesão endotelial, provocando um aumento do recrutamento das moléculas em circulação, como o caso dos leucócitos, e permitindo uma crescente inflamação da parede celular. Assim, conclui-se que a Hcy desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da inflamação, através do seu contributo para a produção de mediadores inflamatórios e, consequentemente, para a progressão da aterosclerose (Weiss *et al.*, 2002; Pezzini *et al.*, 2007; Debreceeni & Debreceeni, 2014).

Vários ensaios com culturas celulares tratadas com homocisteína concluíram que esta induz a expressão da proteína *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1). Esta molécula tem a capacidade de atrair os monócitos em circulação e capturá-los para o espaço endotelial, onde posteriormente são transformados em macrófagos (Christopher *et al.*, 2007).

Além do aumento da expressão de MCP-1, a homocisteína promove também a ampliação da expressão de interleucina 8. O estímulo provocado pela Hcy nestas moléculas é pois mediado pela activação de NF- κ B. Este é um factor de transcrição cuja função é estimular a produção de citocinas e factores de crescimento, os quais contribuem para a inflamação vascular e, por conseguinte, para a aterosclerose (Debreceeni & Debreceeni, 2014). Existe também uma ligação entre a hiperhomocisteinémia e a apoptose celular, através do receptor Fas. A Hcy provoca um aumento da expressão deste receptor e, por consequência, a activação do factor NF- κ B. Este receptor tem, entre outras funções, a capacidade de transmitir um sinal promovendo a sua apoptose celular. Sendo a apoptose um dos eventos que poderá estar na origem da aterosclerose, pode afirmar-se que esta associação é válida (Debreceeni & Debreceeni, 2014).

Proliferação das Células do Músculo Liso Vascular

Um dos componentes característicos da progressão da aterosclerose descreve-se como a proliferação exagerada das células do músculo vascular liso e a acumulação de colagénio. Diversos estudos apontam uma relação entre a Hcy e estes factores, pois a Hcy promove a proliferação de células do músculo liso, provocando o aumento da

síntese e acumulação de colagénio (Christopher *et al.*, 2007). Foram identificadas algumas alterações nas células do músculo liso em pacientes com hiperhomocisteinémia das quais se destacam, o espessamento da camada íntima e o número anormal de lesões fibrosas ricas em colagénio. Esta relação deve-se ao facto de a homocisteína inibir a enzima lisil-oxidase, enzima envolvida na produção de colagénio nas células do músculo liso vascular. Além disto, a Hcy é ainda responsável pela oxidação de lipoproteínas LDL o que leva à activação plaquetária e à libertação de factores de crescimento que promovem a hipertrofia vascular (Christopher *et al.*, 2007).

Stress do Retículo Endoplasmático

A Hcy induz modificações em proteínas do plasma promovendo, desta forma, a alteração de alguns componentes críticos na manutenção da normal função vascular (Pezzini *et al.*, 2007; J. Zhou & Austin, 2009). Uma das hipóteses que define a forma como a Hcy contribui para a desregulação da estrutura proteica prende-se com a formação de Hcy-TI. Este metabolito ao interagir com as proteínas do retículo endoplasmático promove um processo designado por N-homocisteinilização, que provoca a perda de função das proteínas, agora designadas por N-Hcy-proteínas. A acumulação de N-Hcy-proteínas no retículo promove a inflamação vascular e, consequentemente, a progressão da aterosclerose (Yilmaz, 2012). O conjunto destas condições define-se como stress do retículo endoplasmático.

No seguimento da desregulação proteica gerada no retículo, diversas consequências são desencadeadas, nomeadamente, a desregulação do metabolismo lipídico, activação de vias inflamatórias, apoptose celular, entre outros, ficando estas funções alteradas e implícitas na progressão e desenvolvimento da aterosclerose (Pezzini *et al.*, 2007).

A desregulação do normal funcionamento do retículo endoplasmático pode levar à apoptose celular através da alteração da expressão dos genes responsáveis pelo crescimento e diferenciação celular. A Hcy induz a expressão de diversos genes responsáveis pela morte celular, entre eles o gene TDAG51. Este gene induz a apoptose por modificação da normal morfologia celular não permitindo a adesão das células ao endotélio. A Hcy parece induzir a apoptose celular por activação de um sinal que programa a morte celular e por acumulação descontrolada de proteínas desnaturadas no retículo endoplasmático (J. Zhou & Austin, 2009).

Outra das consequências da desregulação no normal funcionamento do retículo endoplasmático prende-se com o metabolismo lipídico. O stress do retículo endoplasmático leva a uma expressão aumentada dos genes responsáveis pela biossíntese de colesterol e triglicéridos, levando à acumulação intracelular de colesterol que mais tarde fomenta o desenvolvimento de aterosclerose (Christopher *et al.*, 2007). Ou seja, dá-se a activação das proteínas de ligação ao elemento regulador do esteroide que, concludentemente, produz o aumento da expressão dos genes responsáveis pela síntese de colesterol e triglicéridos, e promove a acumulação descontrolada de lípidos na parede vascular (J. Zhou & Austin, 2009).

Um outro meio de desregulação do metabolismo lipídico por parte da Hcy é através da produção da Hcy-TI, esta reage com as moléculas de LDL promovendo o aumento da sua concentração em circulação e da sua agregação, o que resulta na formação de trombos e obstrução da circulação sanguínea. (Jakubowski, 2008; Yilmaz, 2012). A PON 1 é uma enzima presente nas lipoproteínas de alta densidade que tem a capacidade de hidrolisar os lípidos em circulação, inibindo a oxidação de LDL e impedindo a sua acumulação nos vasos sanguíneos. Assim, pode dizer-se que a PON 1 confere um efeito protector contra a aterosclerose, pois evita a degradação do endotélio pela LDL e diminui a concentração de Hcy-TI em circulação (Perla-Kajan & Jakubowski, 2010; Yilmaz, 2012).

Alterações na Coagulação Sanguínea

Além de promover o aumento do progresso de aterosclerose, a Hcy aparente ser, também um factor de aceleração do processo de trombose. Não obstante, os mecanismos pelos quais actua ainda não estão totalmente esclarecidos (Debreceeni & Debreceeni, 2014).

O mecanismo central que correlaciona a Hcy e a trombose preconiza que a Hcy promove perturbações na actividade antitrombótica endotelial, predispondo os vasos à formação de trombos por aumento da adesão plaquetária e por diminuição da biodisponibilidade de NO (Weiss *et al.*, 2002; Lentz, 2005). Esta hipótese é suportada por diversos estudos em ratos com défice de apolipoproteína E que apresentavam actividade trombótica exacerbada, quando alimentadas com uma dieta rica em homocisteína. Pensa-se que o mecanismo que provoca estas alterações está relacionado com a actividade diminuta de NO (Ciaccio & Bellia, 2010).

A homocisteína pode também actuar por diminuição da expressão de trombomodulina, proteína anticoagulante expressa na superfície endotelial e essencial à activação de proteína C (Lentz, 2005). A proteína C é um biomarcador da inflamação endotelial, sendo que níveis elevados desta proteína estão relacionados com um maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Ou seja, a Hcy inibe a activação da proteína C, predispondo o organismo à trombose por dificultar a normal coagulação (Sharma, Rai, Tiwari, & Chandra, 2007).

Além deste, foi proposto outro mecanismo que relaciona a proteína C e a Hcy. O factor V tem como função promover a produção de trombina. Contudo, quando não activada a proteína C diminui a capacidade de inactivar o factor V, seu principal substrato, e consequentemente leva à diminuição da produção de trombina. Assim, há acumulação de trombina nos vasos, promovendo um estado de hipercoagulabilidade que aumenta a probabilidade de ocorrência de fenómenos tromboembólicos (Lentz, 2005; Silva *et al.*, 2010). A prevalência do factor V é maior em caucasianos que em africanos e asiáticos, pelo que a ocorrência destes fenómenos é maior na população caucasiana (Silva *et al.*, 2010).

Outros estudos revelam que, em culturas celulares, a Hcy se liga ao terminal amino da anexina II, formando uma ligação dissulfeto com o resíduo de cisteína aí existente. A anexina é um receptor de superfície endotelial para o activador do plasminogénio, inibindo a ligação deste à superfície endotelial, o que promove uma deficiente produção de plasmina. Ou seja, há um comprometimento na degradação correcta dos coágulos, havendo maior probabilidade de formação de trombos e, portanto, podendo dar origem a trombose (Weiss *et al.*, 2002; Lentz, 2005; Pezzini *et al.*, 2007).

Deve referir-se que uma das principais e mais relevantes críticas aos estudos experimentais que demonstram a influência da Hcy no mecanismo da trombose prende-se com o facto de a dose de Hcy usada exceder aquela que normalmente é encontrada no organismo humano, mesmo em casos de distúrbios do metabolismo da Hcy, como a homocistinúria. Assim, apesar de diversas evidências indicarem que a Hcy é um marcador para o tromboembolismo, ainda não é conhecido se estes níveis díspares são uma causa ou uma consequência apenas accidental (Ganguly & Alam, 2015).

3.4. Hiperhomocisteinémia e Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas definem-se como um conjunto de diversas patologias que se distinguem pela deterioração da normal estrutura e funcionamento das células nervosas. Incluem-se neste grupo doenças como Alzheimer, Parkinson, demência, entre outras. (Herrmann & Obeid, 2011). Das patologias mencionadas o Alzheimer é a forma mais comum de demência a nível mundial, afectando cerca de 50 a 70% da população que sofre de doenças neurodegenerativas (Ariogul, Cankurtaran, Dagli, Khalil, & Yavuz, 2005).

Visto que a população mundial se encontra cada vez mais envelhecida, as doenças neurodegenerativas são patologias que têm grande impacto, tanto a nível económico como social, na sociedade actual, sendo de vital importância a descoberta das suas causas bem como do seu adequado tratamento (Ravaglia *et al.*, 2005).

As doenças neurodegenerativas têm múltiplas origens, no entanto, poucos são os factores que podem ser modificáveis, ou seja, que poderão ser prevenidos e corrigidos. Neste campo distinguem-se a hipertensão, hiperlipidémia, tabagismo, diabetes, doenças cardiovasculares e deficiências nutricionais, com as quais se relacionam a homocisteína (Herrmann *et al.*, 2007; Herrmann & Obeid, 2011).

O normal desenvolvimento do sistema nervoso central depende de numerosos factores entre os quais se destaca o papel do folato e das vitaminas B₆ e B₁₂. Vários estudos apontam a carência destes factores como uma das principais causas de defeitos neurológicos encontrados no sistema nervoso de recém-nascidos (Mattson & Shea, 2003). Diversas pesquisas, ao longo dos anos, comprovaram que a população idosa apresenta níveis mais elevados de Hcy, quando comparados aos de crianças, adolescentes e adultos saudáveis. Dado que, com o avançar da idade, o risco de surgimento de doenças neurodegenerativas aumenta, torna-se plausível estabelecer uma ligação entre estes dois factores (Herrmann & Obeid, 2011). Múltiplos ensaios propõem que elevados níveis de Hcy são responsáveis por cerca de 7 a 8% das alterações verificadas na normal função cognitiva de idosos, provocando atrofia das regiões do hipocampo e do córtex cerebral, e aumentando então o risco de desenvolver doença de Alzheimer (Herrmann *et al.*, 2007).

Através do conhecimento do metabolismo da Hcy, sabe-se que o normal desenvolvimento e produção deste aminoácido depende das vitaminas B₆ e B₁₂, bem

como de ácido fólico. Diversos estudos estabelecem uma relação entre a baixa concentração destes co-factores e o aparecimento de doenças neurodegenerativas, visto que a Hcy é considerada como um factor que permite prever o declínio cognitivo e, logicamente, o risco de desenvolver este tipo de doenças. Assim, o cérebro tem diversos mecanismos que permitem antever e proteger-se caso haja carência de folato, de forma a não provocar qualquer dano a nível neurológico. Este facto é comprovado pela observação de níveis elevados de Hcy no líquido cefalorraquidiano em condições de patologia neurológica. Desta forma, pressupõe-se que uma deficiência de ácido fólico, do qual o metabolismo de Hcy necessita para o seu normal funcionamento, pode originar diversos danos irreversíveis a nível neurológico (Obeid & Herrmann, 2006; Zhuo, Wang, & Praticò, 2011). Desta forma, a carência vitamínica pode levar a um aumento do risco de demência. No entanto, caso seja diagnosticada precocemente, esta necessidade pode ser revertida, sendo os danos neurológicos evitados. (Herrmann *et al.*, 2007; Brustolin *et al.*, 2010).

Pensa-se, que outra das causas que pode levar aos níveis de Hcy elevados e, consequentemente, a danos no normal funcionamento do sistema nervoso central se relacionem com defeitos genéticos nas enzimas MTHFR, CBS e MS (Mattson & Shea, 2003). A relação entre a Hcy e as doenças neurodegenerativas já é conhecida há muitos anos, tendo sido descrita pela primeira vez em doentes com mutações na enzima CBS, enzima que promove a conversão de Hcy a cistationa, e está na origem de homocistinúria. (Obeid & Herrmann, 2006; Herrmann *et al.*, 2007).

Assim, sendo comprovada a relação entre a Hcy e as doenças como Alzheimer e demência, conclui-se que a gravidade e severidade destas patologias é tanto maior quanto mais elevada for a concentração de Hcy em circulação (Malaguarnera *et al.*, 2004). Estima-se que o risco de sofrer de doença de Alzheimer é 4,5 vezes maior em pacientes com níveis de Hcy acima de 14µmol/L (Herrmann *et al.*, 2007).

Diversos estudos retrospectivos e prospectivos demonstraram uma associação positiva entre a hiperhomocisteinémia e declínio cognitivo dos indivíduos. Os estudos retrospectivos têm como objectivo comparar os níveis de Hcy entre pacientes com e sem algum tipo de doença neurodegenerativa diagnosticada, revelando que doentes com Alzheimer apresentam níveis de Hcy mais elevados. Por outro lado, os estudos prospectivos são realizados, durante as décadas de vida de maior incidência deste tipo de patologias, em indivíduos saudáveis, que são acompanhados e monitorizados sendo avaliada a relação entre as concentrações de Hcy e o declínio cognitivo apresentado por

estes pacientes. Neste tipo de estudos concluiu-se, também, haver uma associação entre o declínio cognitivo observado e hiperhomocisteinémia (Van Dam & Van Gool, 2009; Zhuo *et al.*, 2011).

No entanto, uma das principais limitações dos ensaios realizados deve-se à concentração de Hcy usada exceder aquela que, sob condições fisiológicas normais, se encontra no organismo humano, bem como o tempo de exposição das células nervosas à Hcy ser limitado o que não corresponde à realidade (Currò *et al.*, 2014).

Desta forma, ainda não se conseguiu estabelecer o mecanismo exacto que liga a Hcy e as doenças neurodegenerativas, sendo ainda pouco claro se esta é uma causa, através da qual se consegue prever a ocorrência destas patologias, ou uma consequência de outras causas, como a deficiência de vitaminas B, que leva ao aceleração do processo de desenvolvimento das doenças neurodegenerativas. Ou seja, ainda não está estabelecido se a Hcy é um factor de risco ou um marcador de risco para este tipo de patologias (Herrmann *et al.*, 2007; Herrmann & Obeid, 2011).

3.4.1. Mecanismos de Lesão Neuronal da Hiperhomocisteinémia

Os mecanismos patológicos através dos quais a Hcy se relaciona com as doenças neurodegenerativas ainda não estão completamente estabelecidos, pelo que nas últimas décadas os investigadores têm revelado um grande empenho em descobrir as ligações entre elas. Várias hipóteses têm sido propostas, nomeadamente indução da apoptose, stress oxidativo, excitotoxicidade mediada pelo glutamato, danos no DNA, entre outros (Mattson & Shea, 2003; Ravaglia *et al.*, 2005; Zhuo *et al.*, 2011).

Uma das hipóteses sugeridas que associa as doenças neurodegenerativas e a Hcy relaciona-se com os efeitos tóxicos de um dos metabolitos derivados da Hcy, nomeadamente o ácido homocisteico. Esta hipótese preconiza que a homocisteína, por si só, seja uma substância neurotóxica quando em concentrações acima das normalmente encontradas no organismo humano (Ariogul *et al.*, 2005). Tanto a Hcy como o ácido homocisteico podem induzir a excitotoxicidade, através da activação do receptor N-metil D-aspartato (NMDA). A estimulação do receptor NMDA desencadeia o aumento da concentração de ião cálcio em circulação, bem como de ROS, promovendo a toxicidade e induzindo a apoptose das células nervosas (Obeid & Herrmann, 2006).

Tal como descrito anteriormente, a Hcy contém um grupo tiol livre que pode ser oxidado provocando o aumento da produção das ROS e, em consequência, promovendo o stress oxidativo. Alguns estudos demonstram que uma exposição de 4 a 5 horas das células do hipocampo a concentrações extremamente elevadas de Hcy levam ao aumento de duas vezes mais a produção destas espécies, provocando efeitos neurotóxicos irreversíveis (Currò *et al.*, 2014).

Outra hipótese que pode explicar o stress oxidativo causado pela homocisteína nas células nervosas é o facto da carência de ácido fólico e Hcy comprometer a actividade de algumas enzimas antioxidantes, nomeadamente a Gpx-1, responsáveis por manter o equilíbrio oxidativo celular e, assim, potenciando os efeitos negativos das ROS (Mattson & Shea, 2003; Obeid & Herrmann, 2006).

Concentrações anormalmente altas de Hcy têm sido associadas ao aumento de concentração da enzima SAH. Em condições normais, a enzima SAH é hidrolisada a Hcy, sendo esta uma reacção reversível que favorece a síntese de SAH (Figura 2 a)). No entanto, na presença de elevadas concentrações de Hcy, a hidrólise de homocisteína é favorecida, provocando uma anormal acumulação de SAH. Sabe-se que a proporção das enzimas SAM/SAH, bem como as baixas concentrações de ácido fólico no líquido cefalorraquidiano, se relacionam com o envelhecimento neuronal, sendo por isso considerados marcadores de declínio neurológico (Mattson & Shea, 2003; Herrmann & Obeid, 2011). Assim, o stress oxidativo também pode ser promovido através da redução de espécies antioxidantes que protegem as células, por aumento dos níveis de SAH (Zhuo *et al.*, 2011).

Uma vez que o sistema nervoso central é um sistema extremamente vulnerável a quaisquer alterações no equilíbrio que o mantém, o stress oxidativo pode considerar-se um factor fulcral na promoção do dano das funções cognitivas importantes (Zhuo *et al.*, 2011).

Além de tudo isto, outra das capacidades da homocisteína deve-se ao facto de esta apresentar a capacidade de modificar os mecanismos de reparação do DNA conduzindo à apoptose celular (Obeid & Herrmann, 2006; Zhuo *et al.*, 2011). A hiperhomocisteinémia promove a morte das células nervosas através da hipometilação do DNA provocando, um aumento da produção da proteína precursora de amilóide, bem como do péptido β -amilóide, através da desregulação da expressão do gene presenilina 1. No entanto, a expressão do gene presenilina 1 pode ser alterada, e diminuída, pela enzima SAM provocando a diminuição da produção do péptido β -amilóide. Assim, se a

carência de ácido fólico e vitaminas B₆ e B₁₂ for tratada adequadamente os níveis de SAM não são desregulados e não se dá a acumulação excessiva do péptido β -amilóide, facto característico da doença de Alzheimer. Ou seja, a hiperhomocisteinémia estimula a produção e deposição excessiva de péptido β -amilóide no cérebro, acelerando o processo de desenvolvimento deste tipo de demência (Obeid & Herrmann, 2006; Zhuo *et al.*, 2011).

Outra das evidências que liga a hiperhomocisteinémia e as doenças neurodegenerativas é o facto de esta provocar a desfosforilação da proteína tau, um dos elementos característicos da doença de Alzheimer e que está associada a perda de memória. A desfosforilação da proteína tau está dependente da proteína fosfatase 2A, responsável por este processo e cuja concentração se apresenta significativamente diminuída em pacientes com Alzheimer. Por sua vez, a proteína fosfatase 2A é regulada pela proteína fosfatase 1, sendo esta última depende da enzima SAM. Assim, uma vez reduzida a capacidade de metilação do DNA, a concentração da proteína tau é aumentada, diminuindo o risco de doenças neurodegenerativas (Obeid & Herrmann, 2006; Zhuo *et al.*, 2011).

4. Métodos de Diagnóstico e Quantificação da Hiperhomocisteinémia

A atenção da comunidade científica e médica internacional, sobre os níveis de homocisteína apresentados pelos indivíduos e a sua utilidade na avaliação do risco e no diagnóstico da hiperhomocisteinémia tem sido crescente. Este interesse deve-se ao facto de os níveis elevados de Hcy terem vindo a ser correlacionados com múltiplas patologias que afectam o ser humano, com especial destaque para as doenças cardiovasculares. Como tal, um diagnóstico correcto de hiperhomocisteinémia é fundamental, visto que diferenças mínimas na sua concentração constituem importantes factores na identificação de algumas patologias (Sawuła *et al.*, 2008; Cevalco, Piątek, Scapolla, & Thea, 2010). Deste modo, desde os anos 80 e 90 os investigadores têm vindo a desenvolver diversas técnicas para o correcto diagnóstico da hiperhomocisteinémia. Os métodos desenvolvidos para quantificação da Hcy devem ser o mais precisos e exactos quanto possível, de forma a reflectirem a real concentração de Hcy no individuo (Salehzadeh, Mokhtari, & Nematollahi, 2014;. Dayal & Lentz, 2015)

De acordo com a literatura, indivíduos saudáveis apresentam concentrações de Hcy plasmática basal entre 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$, se em jejum (Perla-Kaján *et al.*, 2007). Contudo, acima destes valores desenvolve-se uma condição que se classifica como hiperhomocisteinémia. Deste modo, e de acordo com as concentrações de Hcy encontradas no sangue a hiperhomocisteinémia pode classificar-se como ligeira, moderada ou severa (Sawuła *et al.*, 2008; Ganguly & Alam, 2015).

A concentração total de Hcy define-se como o conjunto de todas as formas de Hcy em circulação no organismo humano (Perla-Kaján *et al.*, 2007). Assim, a determinação da concentração exacta de Hcy é uma tarefa difícil devido à sua instabilidade e à diversidade de formas que apresenta. Os primeiros métodos desenvolvidos para determinação da Hcy em circulação baseavam-se na medição e quantificação da Hcy plasmática total, devido aos obstáculos que a quantificação de cada uma das formas de Hcy oferecia. Assim, a partir desta data os métodos desenvolvidos baseiam-se na determinação da concentração de Hcy plasmática total (Rafii *et al.*, 2009).

Quando se procede à recolha das amostras a ser analisadas são necessários diversos cuidados para a manutenção da sua integridade. Primeiramente, e visto que as

análises de Hcy são efectuadas no plasma, é necessária a sua separação do soro, por centrifugação, ainda antes de a amostra ser armazenada (McMenamin, Himmelfarb, & Nolin, 2009). Posteriormente, e para que a medição seja feita correctamente, é fundamental o tratamento da amostra com anticoagulante, normalmente o citrato de sódio ou o EDTA (McMenamin *et al.*, 2009). Depois destas etapas a amostra deve ser colocada imediatamente congelada a -70°C até à sua análise, para que a descida da temperatura retarde a libertação de Hcy das células sanguíneas e para que a actividade enzimática seja inibida. Todas estas etapas constituem o pré-tratamento da amostra e são morosas, o que constitui uma clara desvantagem na prática clínica em que a rapidez e celeridade são fundamentais (Tomaiuolo, Vecchione, Margaglione, Pisanelli, & Grandone, 2009; Isokawa *et al.*, 2014).

Após estes primeiros passos deve proceder-se o mais rapidamente possível ao armazenamento da amostra pois, é necessário ter em consideração que, quanto maior o tempo decorrido entre a recolha e o armazenamento, existe um aumento da concentração de Hcy ligada a proteínas, por redistribuição dos grupos tiol da amostra. Isto deve-se ao facto de os grupos tiol serem importantes tampões do organismo, que têm a função de manter a integridade celular, e que quando estão livres em circulação são imediatamente auto-oxidados, o que neste caso não é desejável (Rafii *et al.*, 2009; Tomaiuolo *et al.*, 2009).

Desta forma é essencial a redução das ligações dissulfeto, sendo este um passo de grande importância. A escolha do agente redutor é fundamental, pois além de permitir a redução destas ligações, tornando-as acessíveis aos agentes de derivatização, também mantêm, os grupos tiol na sua forma reduzida até à derivatização. (Głowacki & Bald, 2009; Isokawa *et al.*, 2014). Outros dos factores a ter em conta na escolha do agente redutor é que este deve ser adequado ao método de detecção que será posteriormente aplicado. A compatibilidade dos agentes redutores e de derivatização é de extrema importância, pois quando estes são incompatíveis a formação de derivados da Hcy é permitida, interferindo com os resultados obtidos (Głowacki & Bald, 2009; Peixoto, 2013).

De entre os vários agentes redutores disponíveis, os mais habituais são os seguintes: ditioneitol (DTT), ditioeritritol (DTE), 2-mercaptoetanol, borohidreto de sódio e de potássio e tri-n-butil fosfina (TBP). De entre estes, o borohidreto de sódio e de potássio são os mais potentes todavia, a sua utilização revela-se muito trabalhosa e com possível interferência no método de separação. Relativamente aos reagentes DTT,

DTE e 2-mercaptoetanol, as suas principais desvantagens devem-se ao facto de formarem ligações com reagentes específicos para os grupos tiol, podendo consumir os reagentes de derivatização e, assim, interferir na detecção dos tióis. O reagente TBP apresenta algumas limitações por ser irritante, ter odor desagradável e ser pouco solúvel em água. Para além destes, existe, ainda, outro agente redutor: o tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP), que apresenta como principais vantagens não ser volátil, ser estável e solúvel em água, podendo ser empregue com segurança em diversos métodos. (McMenamin *et al.*, 2009; Rafii *et al.*, 2009; Tomaiuolo *et al.*, 2009).

Deste modo, o desenvolvimento de técnicas para detecção directa de Hcy nas amostras recolhidas, sem aplicar técnicas de separação, torna-se uma tarefa árdua devido às múltiplas interferências a que as amostras biológicas são sujeitas. Posto isto, os métodos de análise e diagnóstico da hiperhomocisteinémia têm a necessidade de empregar técnicas de separação, de forma a remover essas interferências (Salehzadeh *et al.*, 2014).

A técnica ideal para medir a concentração de Hcy deve apresentar algumas características essenciais, como ser simples, sensível e precisa, de forma a poder ser usada na rotina da prática clínica (McMenamin *et al.*, 2009). Os métodos actualmente disponíveis para determinação de Hcy são numerosos, destacando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GS-MS), imunoensaios ou electroforese capilar (Zappacosta *et al.*, 2006; Isokawa *et al.*, 2014).

4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

De entre os diversos métodos desenvolvidos para quantificação da Hcy, a HPLC é considerada a metodologia de eleição para a sua determinação. Isto deve-se às diversas vantagens que esta técnica apresenta, nomeadamente o facto de ser um método facilmente automatizado ou usado em conjunto com outras metodologias de detecção e poder ser usado na determinação de várias espécies em simultâneo (Sawuła *et al.*, 2008; Rafii *et al.*, 2009).

Contudo, a cromatografia HPLC requer equipamento especializado o que tem elevados custos para os laboratórios, sendo esta uma das suas principais desvantagens. Outra das desvantagens é o facto de, por vezes, a separação dos compostos ser difícil,

pelo que a fraca resolução desta técnica poderá comprometer a sua selectividade (Rafii *et al.*, 2009; Peixoto, 2013).

Esta é uma técnica difícil de padronizar devido às múltiplas variações existentes. Portanto, mesmo apesar de quase todos os métodos envolverem um passo de redução das ligações dissulfeto e a derivatização de grupos tiol, a principal diferença entre eles é relativa ao método de detecção usado após a separação por HPLC (Peixoto, 2013). Existem múltiplos passos na técnica de cromatografia que poderão contribuir para a variabilidade dos resultados. Deste modo, uma das opções que proporciona maior homogeneidade e fiabilidade entre as diversas variações desta técnica é o uso de um padrão interno. Como exemplos de padrões internos empregados em HPLC destacam-se a N-acetilcisteína, cisteamina ou 2-mercaptopropionilglicina (Sawula *et al.*, 2008; McMEnamin *et al.*, 2009).

Note-se que a cromatografia por HPLC baseia-se na separação da Hcy de outros compostos presentes nas amostras requerendo, tal como supracitado, a redução das ligações dissulfeto e a derivatização dos grupos tiol. Deste modo, é essencial a compatibilidade do agente redutor e do agente de derivatização na escolha da técnica de detecção mais adequada (Peixoto, 2013).

Deteção por Fluorescência

Este é o método de detecção acoplado à cromatografia por HPLC mais usado. A detecção do grupo tiol por fluorescência baseia-se na marcação destes grupos com um reagente fluorescente, seguido de cromatografia por HPLC. Este é um processo altamente sensível e selectivo, de equipamento barato e relativamente simples. Além destes, outros dos benefícios deste método de detecção é o facto de permitir a análise simultânea de vários tióis (Tabela 2) (Nelson, Satterfield, Sniegowski, & Welch, 2005; McMEnamin *et al.*, 2009; Cevalco *et al.*, 2010).

Após a redução, as amostras a analisar são submetidas a ultrafiltração, para remoção das proteínas, e sua posterior precipitação. Como agentes de precipitação destacam-se o ácido sulfossalicílico, ácido perclórico e o ácido tricloroacético. Depois desta etapa as amostras são então centrifugadas, sendo o sobrenadante posteriormente submetido a derivatização (McMenamin *et al.*, 2009; Isokawa *et al.*, 2014).

Os reagentes de derivatização mais populares, no caso do método de detecção por fluorescência, são os seguintes: mBrB (monobromobimano), SBD-F (7-fluoro-

2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonato), ABD-F (4-aminossulfonil-7-fluoro-2,1,3-benzodiazol) e o OPA (ortoftaldeído) (McMenamin *et al.*, 2009; Cevasco *et al.*, 2010).

Entre estes o SBD-F é o mais usado. De entre as suas principais vantagens, destacam-se a sensibilidade e especificidade para os grupos tiol. Por si só, o SBD-F não apresenta características fluorescentes, o que é uma vantagem visto que permite a obtenção de um cromatograma sem contaminações. Mas os derivados que origina produzem um sinal fluorescente forte e com excelente estabilidade, sendo facilmente separados dos outros metabolitos presentes na amostra (Cevasco *et al.*, 2010; Isokawa *et al.*, 2014). Uma das principais desvantagens é o facto de este apenas actuar sob condições extremas, neste caso a 60°C durante 1 hora, podendo, nestas condições, dar-se a degradação dos grupos tiol (McMenamin *et al.*, 2009; Isokawa *et al.*, 2014).

O OPA é outro dos reagentes de derivatização usados na detecção por fluorescência. Tal como o SBD-F, não é específico para grupos tiol mas reage rapidamente com estes, produzindo derivados fluorescentes na sua presença (Głowacki & Bald, 2009; Isokawa *et al.*, 2014). Os principais obstáculos do uso deste reagente prendem-se com o facto de ser muito sensível a variações de pH, apresentar reactividade com outros aminoácidos e ser fotossensível, pelo que necessita de protecção da luz quando está a ser manuseado (W. Wang *et al.*, 2005). Além disso, por vezes, não proporciona um rendimento satisfatório (Głowacki & Bald, 2009).

Quanto ao mBrB reage rapidamente, mas não especificamente, com os grupos tiol, à temperatura ambiente. Este tem a desvantagem de os produtos da sua degradação, bem como o composto em si e as suas impurezas, serem fluorescentes e interferirem na correcta determinação da Hcy. Além destes, outras são as limitações apresentadas são a instabilidade à temperatura ambiente, o facto de ser fotossensível e as complexas técnicas cromatográficas de que necessita para ser eluído eficazmente (W. Wang *et al.*, 2005; McMenamin *et al.*, 2009).

Detecção por Espectrometria de Massa

A GS-MS é um dos métodos mais efectivos na detecção e quantificação de Hcy. Tem diversas vantagens, das quais se destacam: elevada sensibilidade e especificidade e baixo limite de detecção. No entanto, este método necessita de equipamento específico, e de elevado custo, além de não permitir a detecção simultânea de vários grupos tiol (Tabela 2) (Nolin, McMenamin, & Himmelfarb, 2007; Tomaiuolo *et al.*, 2009).

Apesar de a derivatização ser um dos passos normalmente usados na detecção por espectrometria de massa, recentemente alguns dos estudos propuseram a supressão desta etapa, conduzindo à simplificação do processo de preparação da amostra. Contudo, os resultados obtidos poderão não ser os mais correctos já que há o aumento da oxidação da amostra e a perda de especificidade do método, visto que outros metabolitos, para além da Hcy, que antes não iriam interferir, poderão ser detectados (Isokawa *et al.*, 2014).

A espectrometria de massa em tandem é um método que oferece múltiplas vantagens relativamente à espectrometria de massa simples, nomeadamente devido à maior selectividade que apresenta, pois é capaz de monitorizar apenas os iões escolhidos. Apresenta também maior sensibilidade e menor tempo de análise, já que o tempo despendido na preparação da amostra é menor e este método não necessita de derivatização (Rafii *et al.*, 2007; Rafii *et al.*, 2009). Outra das vantagens é o facto da cromatografia com este método de detecção apresentar boa separação dos vários componentes da amostra. Considera-se, também, um método que pode ser usado na análise de rotina pois, tem a capacidade de identificar inequivocamente a Hcy de entre todos os metabolitos das amostras (Rafii *et al.*, 2007; Tomaiuolo *et al.*, 2009).

Deteção UV/Vis

Este método baseia-se na detecção da radiação absorvida pelas ligações ou grupos funcionais, neste caso o grupo tiol, quando ocorrem transições electrónicas por absorção de radiação na região do UV/ Vis. Trata-se de um método quantitativo, visto que se pode medir a concentração de Hcy, ou seu derivado, pela intensidade de radiação absorvida pela mesma (Peixoto, 2013).

Para que a Hcy seja detectada, deve formar um derivado com absorção UV/Vis suficiente para que seja possível medir as concentrações de tióis. Ou seja, é necessário um passo de derivatização prévio, pois os grupos tiol não permitem a sua detecção directa. Os agentes de derivatização não devem apresentar absorção na ausência do grupo tiol e devem ser capazes de reagir rápido e especificamente com estes grupos, para formar um produto estável (Peixoto, 2013; Isokawa *et al.*, 2014).

Os reagentes de derivatização mais usados na detecção Uv/Vis são BCPB (4-bis (4-carboxilato-1-piridínio)), CMQT (2-cloro-1-metilquinolínio tetrafluoroborato) e CMPI (iodeto de 2-cloro-1-metilpiridina) (Peixoto, 2013; Isokawa *et al.*, 2014).

A detecção por UV/Vis é um método sensível e de elevada reprodutibilidade; contudo, apresenta menor sensibilidade e especificidade quando comparado a outros métodos de detecção, principalmente quando equiparado à detecção por fluorescência (Tabela 2) (Nolin *et al.*, 2007; McMenamin *et al.*, 2009).

Detecção Electroquímica

A detecção electroquímica é uma ferramenta importante na detecção de grupos tiol e ligações dissulfeto. Este método funciona por oxidação directa da Hcy na superfície dos eléctrodos que incluem: o carbono, a grafite, a platina, o ouro e a prata. Uma das principais vantagens deste método é que evita a etapa de derivatização. Contudo, opera a elevados potenciais para possibilitar a oxidação da Hcy nos eléctrodos, já que a transferência de electrões entre eles é lenta, o que poderá originar uma menor selectividade, quando comparada a outros métodos de detecção. Isto porque devido aos elevados potenciais usados é possível que outras espécies presentes na amostra, que normalmente não reagiriam, possam reagir (Fei *et al.*, 2005; Agui, Penafarfal, Yanezseden, & Pingarron, 2007; Salehzadeh *et al.*, 2014).

De entre os eléctrodos usados na detecção electroquímica destacam-se os de carbono. Este tipo de eléctrodos tem como principais benefícios o facto de terem uma boa condutividade, promovendo a fácil transferência de electrões entre o eléctrodo e o analito e criando elevada estabilidade (Tabela 2) (Fei *et al.*, 2005).

Além destes, outro dos eléctrodos usados na detecção electroquímica inclui as nanopartículas de ouro. Neste caso, os resultados são substancialmente melhores quando comparados aos eléctrodos tradicionais, já que não necessita de potenciais tão elevados para oxidação da Hcy, melhorando a selectividade do método (Ducros *et al.*, 2002; Agui *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos vários métodos de detecção (adaptado de Ubbink, 2000; Peixoto, 2013).

Método	Vantagens	Desvantagens
Detecção por fluorescência	<ul style="list-style-type: none"> • Barato • Elevada sensibilidade • Elevada selectividade • Equipamento barato • Elevada reprodutibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Derivatização instável e sensível à luz
Detecção por espectrometria de massa	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada sensibilidade • Elevada especificidade • Baixo limite de detecção 	<ul style="list-style-type: none"> • Equipamento caro • Não permite a análise simultânea de vários tióis
Detecção por UV/Vis	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada reprodutibilidade • Derivatização simples 	<ul style="list-style-type: none"> • Pouca sensibilidade • Pouca especificidade
Detecção electroquímica	<ul style="list-style-type: none"> • Barato • Elevada sensibilidade • Elevada selectividade • Sem derivatização • Detecção simultânea de grupos tiol oxidados e reduzidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil estabilização do detector

4.2. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é um dos muitos métodos disponíveis para quantificação da concentração de Hcy nas amostras biológicas. No entanto, mesmo apesar da sua elevada sensibilidade, não é o método mais usado devido à elevada polaridade apresentada pela Hcy e seus metabolitos, o que faz com que a derivatização seja um passo obrigatoriamente necessário antes da sua análise, de forma a aumentar a volatilidade da amostra (Agui *et al.*, 2007).

Outro dos obstáculos deste método é a sua pouca especificidade, já que a Hcy contém, na sua estrutura, maioritariamente grupos polares, o que faz com que a sua extracção por solventes orgânicos seja problemática (Nekrassova, Lawrence, & Compton, 2003).

4.3. Electroforese Capilar

A electroforese capilar é um dos métodos usados na separação de Hcy que tem vindo a ganhar cada vez maior popularidade junto da comunidade científica no diagnóstico da hiperhomocisteinémia principalmente, como meio complementar às técnicas tradicionais, como o caso da HPLC. (Nekrassova *et al.*, 2003).

Este é um processo simples, eficaz e rápido que, comparativamente a HPLC tem a vantagem de necessitar de um menor volume de amostra, ter bom poder de resolução, necessitar de pouco tempo de análise e equipamento simples (Nekrassova *et al.*, 2003; Mu, Zhao, Huang, & Ye, 2012).

Detecção Electroquímica

Tal como referido anteriormente de entre os diversos tipos de eléctrodos usados na detecção electroquímica podem destacar-se os eléctrodos de carbono e de nanopartículas de ouro (Nekrassova *et al.*, 2003). As características deste tipo de detecção foram abordadas no ponto 4.1. deste capítulo, sendo as suas principais vantagens e desvantagens descritas na Tabela 2.

Detecção por Fluorescência

Tal como para a cromatografia por HPLC também para a electroforese capilar permite o uso do método de detecção por fluorescência. Tal como a detecção electroquímica, as características deste tipo de detecção estão descritas no ponto 4.1. e na Tabela 2.

Detecção por Quimiluminescência

Este método de detecção acoplado à electroforese capilar apresenta elevada sensibilidade, tendo vindo a substituir outras técnicas de detecção mais comuns (Mu *et al.*, 2012).

O reagente n-4-aminobutil-n-isoluminol de etilo (ABEI) é usado neste tipo de detecção para marcar a Hcy, pois é quimiluminescente quando oxidado. Este reage

selectivamente com grupos tiol, sendo separado por electroforese capilar, contribuindo para a elevada sensibilidade do método (Mu *et al.*, 2012).

A detecção por quimiluminescência apresenta como principais vantagens a sua sensibilidade, precisão e o facto de o pré-tratamento da amostra ser mínimo, permitindo, que seja um método aplicado à análise de rotina de Hcy (Mu *et al.*, 2012).

4.4. Imunoensaios

Outro dos métodos de diagnóstico da hiperhomocisteinémia propostos são os imunoensaios, os quais se baseiam num passo simples, comum a todos, de redução da Hcy e a sua conversão a SAH, por acção da enzima SAH hidrolase. Todos os imunoensaios usam um único anticorpo (Ac) contra a enzima SAH. Este Ac anti-SAH é reconhecido e quantificado de forma a analisar a concentração de Hcy na amostra (Ducros *et al.*, 2002). De entre os vários tipos de imunoensaios aqueles que se destacam no diagnóstico de hiperhomocisteinémia são: Imunoensaio de Fluorescência por Polarização (FPIA), Enzimoimunoensaio (EIA) e Imunoensaio por Quimioluminescência (ICL).

O FPIA é o imunoensaio mais usado na análise e pesquisa de níveis anómalos de Hcy (Ducros *et al.*, 2002). Este baseia-se na quantificação da fluorescência emitida por Ac marcados com fluorocromos, que irão detectar antígenos específicos nas amostras a analisar. A fluorescência emitida é inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra, ou seja, à concentração de Hcy (Powers & Moat, 2000; Ducros *et al.*, 2002; Lowell, 2004).

O ensaio EIA caracteriza-se por um Ac monoclonal ser fixado a uma placa de microtitulação que é incubada com a amostra a analisar, permitindo a ligação Ac e Ac anti-SAH, marcado com uma enzima, resultando na captura de toda a SAH da amostra que é posteriormente quantificada (Ducros *et al.*, 2002; Lowell, 2004).

O ICL necessita de reagentes específicos quimioluminescentes, como os derivados do luminol, para conseguir gerar quimioluminescência. Neste imunoensaio o substrato é incubado com as enzimas para produzir um sinal quimioluminescente. De entre os substratos disponíveis, o mais usado inclui as enzimas peroxidase e fosfatase alcalina. Os derivados do luminol actuam competindo com Ac anti-SAH, marcado com

as enzimas, gerando o sinal quimioluminescente que dará origem à quantificação de Hcy na amostra. (Lowell, 2004). (Powers & Moat, 2000; Ducros *et al.*, 2002).

As principais vantagens e desvantagens de todos estes tipos de imunoensaios estão descritos abaixo na Tabela 3.

Tabela 3 - Principais vantagens e desvantagens dos vários tipos de imunoensaios (Powers & Moat, 2000; Ducros *et al.*, 2002).

Método	Vantagens	Desvantagens
FPIA	<ul style="list-style-type: none"> • Simples • Elevada precisão 	<ul style="list-style-type: none"> • Reagentes caros
EIA	<ul style="list-style-type: none"> • Equipamento barato 	<ul style="list-style-type: none"> • Reagentes caros • Pouca especificidade
ICL	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido • Elevada reprodutibilidade • Quantidade mínima de amostra necessária 	<ul style="list-style-type: none"> • Reagentes caros

Para concluir, de entre os múltiplos métodos apresentados para a quantificação de Hcy nas amostras biológicas, os mais usados são a cromatografia HPLC com detecção por fluorescência ou UV/Vis. Devido à emergente preocupação relativa à homocisteína será importante o melhoramento dos métodos já existentes ou o desenvolvimento de novos métodos de modo a que o diagnóstico da hiperhomocisteinémia seja mais rápido, simples e eficaz (Isokawa *et al.*, 2014).

5. Perspectivas de Tratamento da Hiperhomocisteinémia

Os factores de risco cardiovascular mundialmente aceites, como hipertensão, hiperlipidémia, hábitos tabágicos, entre outros, não conseguem oferecer uma justificação causal para todos os eventos cardiovasculares de que há conhecimento. Assim, novos marcadores de risco emergem como potenciais factores de prevenção destes mesmos eventos, de entre os quais é exemplo a hiperhomocisteinémia. A concentração de Hcy acima de níveis normais é um factor de risco modificável para as doenças cardiovasculares (Ji *et al.*, 2013). Através da análise dos resultados apresentados por diversos estudos retrospectivos e prospectivos desde as décadas de 80 e 90, é possível inferir uma relação entre a hiperhomocisteinémia e o maior risco de doenças cardiovasculares nomeadamente, associando a redução dos níveis de Hcy com diminuição do risco destas mesmas doenças em pacientes hiperhomocisteinémicos. Com a confirmação desta associação, poder-se-á, do mesmo modo colocar a hipótese de que a intervenção farmacológica para diminuição dos níveis de Hcy poderá provocar uma menor frequência da ocorrência destas doenças. Deste modo, e devido aos resultados contraditórios apresentados pelos estudos, a comunidade médica e científica pretende indagar a possibilidade de a hiperhomocisteinémia ser uma causa ou uma consequência destes mesmos eventos (Pezzini *et al.*, 2007; Debreceni & Debreceni, 2014; Dayal & Lentz, 2015).

De entre os diversos factores que se crê poderem estar na origem do aumento dos níveis de homocisteína no organismo, destaca-se os baixos níveis de vitaminas B₆, B₉ e B₁₂. Assim, podemos afirmar que os níveis de Hcy são um indicador das carências vitamínicas dos indivíduos, sendo de esperar que a hiperhomocisteinémia seja uma patologia com maior prevalência em algumas regiões como África, Índia, América central e do sul ou México, onde as condições de vida e, logicamente, o estado nutricional das suas populações é menor. Com efeito, comparativamente aos países desenvolvidos, verifica-se uma maior tendência da população dos países em desenvolvimento padecer de hiperhomocisteinémia devido a deficiências vitamínicas (Christopher *et al.*, 2007; Zappacosta *et al.*, 2013; Kotwal, Kotwal, Bhalla, Singh, & Nair, 2015)

Em alguns países desenvolvidos, como o caso dos Estados Unidos, foi instaurada uma política de fortificação obrigatória de ácido fólico em cereais. Desde a

sua implementação verificou-se uma redução da mortalidade associada a AVC, doenças cardiovasculares e trombose venosa (Debreceeni & Debreceeni, 2014; Kotwal *et al.*, 2015; Stampfer & Willett, 2015). Estima-se que nos Estados Unidos, desde que esta medida foi aprovada, os níveis de Hcy médios dos indivíduos saudáveis passaram a situar-se abaixo dos 10 $\mu\text{mol/L}$ (Dayal & Lentz, 2015). Estima-se que através da aplicação desta medida, foram evitadas cerca de 17 000 mortes por doenças cardiovasculares relacionadas com a hiperhomocisteinémia (Huang *et al.*, 2012).

Comparando os países com e sem fortificação de ácido fólico, verificou-se que nos países que não possuem esta obrigação, os níveis de Hcy baixaram cerca de 23% com suplementação apenas de vitamina B₉ ou, no caso da administração conjunta com vitamina B₁₂, reduziram cerca de 30%. Por outro lado, nos países com esta fortificação, os efeitos da suplementação vitamínica foram menos evidentes, com uma redução de Hcy de cerca de 20% (Clarke *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2013).

As primeiras evidências de que a suplementação vitamínica, em indivíduos saudáveis, poderá beneficiar a redução dos níveis de Hcy foram encontradas no ano de 1988 num estudo desenvolvido por Brattström *et al.*. Desde esta primeira descoberta, diversos estudos foram realizados demonstrando que a ingestão de 0,65 a 10 mg de ácido fólico, isoladamente ou em simultâneo com vitaminas B₆ e B₁₂, reduz os níveis de Hcy em cerca de 25 a 50%, tanto em indivíduos saudáveis como com hiperhomocisteinémia (Huang *et al.*, 2012). Contudo, a utilidade desta terapêutica em pacientes com historial de eventos cardiovasculares ainda não está totalmente esclarecida (Christopher *et al.*, 2007).

As vitaminas B₆, B₉ e B₁₂ podem ser adquiridas pelo indivíduo através da sua dieta através da ingestão de alimentos que contêm elevados níveis destas vitaminas, nomeadamente as frutas e vegetais. Refira-se que, antes do início da terapêutica farmacológica, poderá ser considerada primeiramente uma mudança alimentar que restabeleça os níveis normais destas vitaminas, já que vários estudos comparando estes dois métodos apresentaram resultados semelhantes (Zappacosta *et al.*, 2013). Deste modo, pode dizer-se que uma terapêutica com o objectivo de reduzir os níveis de Hcy não oferece um risco para os doentes independentemente das patologias de que padecem e, mesmo em indivíduos saudáveis, a diminuição dos níveis de Hcy é benéfica (Kotwal *et al.*, 2015).

As células endoteliais são especialmente susceptíveis a aumentos drásticos nas concentrações de Hcy, já que a única forma que têm de eliminar o seu excesso do

organismo é através da acção das enzimas MTHFR e MS. De entre as disfunções apresentadas por estas enzimas, a mutação da enzima MTHFR com genótipo TT diminui a sua actividade enzimática, o que provoca a redução dos níveis de vitamina B₉ em circulação. Assim sendo, é de esperar que indivíduos que possuam este genótipo apresentem uma maior predisposição e maior risco de eventos cardiovasculares. Desta forma, a regular acção das enzimas participantes no metabolismo da Hcy é essencial para o normal funcionamento das células endoteliais e, consequentemente, para a manutenção dos níveis normais de Hcy (Debrececi & Debrececi, 2014; Dayal & Lentz, 2015; Stampfer & Willett, 2015).

Tal como referido anteriormente, ao longo dos anos foram desenvolvidos estudos retrospectivos e prospectivos com o objectivo de perceber a relação entre a homocisteína e as doenças cardiovasculares para, consequentemente, se conseguirem desenvolver estratégias terapêuticas que diminuíssem o risco destas doenças. Contudo, os resultados obtidos nestes estudos foram contraditórios pelo que diversos investigadores desenvolveram ensaios clínicos de forma a testar a ligação entre a suplementação vitamínica, que diminui os elevados níveis de Hcy, e se esta poderá ter efeito na diminuição do risco ou impedir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Huang *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013; Dayal & Lentz, 2015).

O primeiro ensaio clínico realizado para comprovar esta relação foi o estudo *Vitamin Intervention for Stroke Prevention* (VISP), este foi um estudo em dupla ocultação, randomizado e controlado conduzido durante um período de dois anos, em pacientes que tinham sofrido há pouco tempo um AVC. O objectivo foi avaliar os benefícios da terapia com várias dosagens de vitaminas B₆, B₁₂ ou ácido fólico (Tabela 4). Neste estudo os pacientes foram divididos em dois grupos distintos sendo que receberam uma alta ou baixa dosagem destas vitaminas, conforme o conjunto em que estavam inseridos. Contudo, este ensaio falhou ao não conseguir provar a relação entre a eficácia do tratamento para prevenção do aumento dos níveis de Hcy. Ou seja, a suplementação vitamínica provocou uma redução moderada nos níveis de Hcy, em cerca de 2 µmol/L no grupo de dosagem elevada, mas isto não se reflectiu em qualquer efeito na redução do risco de AVC (Ciaccio *et al.*, 2008; Ciaccio & Bellia, 2010; Kernan *et al.*, 2014; Ntaios, 2015).

Uma das limitações deste ensaio, que poderão ter estado na origem dos resultados obtidos, é o facto de a terapêutica usada não ser a mais adequada visto que a dosagem de vitamina B₁₂ era considerada baixa, mesmo no grupo de indivíduos que

receberam a maior dosagem vitamínica. Outra das limitações foi, também, o facto de o período de acompanhamento de dois anos ser considerado curto e não permitir obter resultados estatisticamente significantes. Além disto, também os baixos valores de Hcy basal encontrados nos pacientes poderão ter conduzido a estes resultados (Pezzini *et al.*, 2007; Ciaccio & Bellia, 2010). Todavia, foi encontrada uma diferença na concentração de Hcy observada entre os grupos com alta e baixa dosagem, o que pode dever-se à diferença entre os países estudados com ou sem aplicação de fortificação de ácido fólico (Ntaios, 2015).

Deste modo, e devido aos resultados obtidos neste primeiro estudo, foi desenvolvido um novo ensaio para estudar a importância da terapêutica com ácido fólico e vitaminas B₆ e B₁₂ em doentes que tiveram AVC recentemente. O estudo randomizado *Vitamins To Prevent Stroke* (VITATOPS) teve como ponto de partida o estudo VISP (Tabela 4). Neste estudo, os sujeitos analisados sofreram recentemente de qualquer um dos tipos de AVC conhecidos, e os critérios de elegibilidade relativamente os níveis de Hcy não foram aqui aplicados, ao contrário do que aconteceu no estudo anteriormente referido. Concluindo, neste estudo também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em estudo (Pezzini *et al.*, 2007; Ntaios, 2015).

O estudo randomizado *The Heart Outcomes Prevention Evaluation* (HOPE 2) teve como principais objectivos compreender se o tratamento usado para reduzir os níveis de Hcy em circulação tem algum efeito na redução do risco cardiovascular em doentes de alto risco, nomeadamente com diabetes ou com historial de doenças cardiovasculares (Tabela 4). O estudo concluiu que, durante os cinco anos de acompanhamento dos doentes, o tratamento vitamínico diário aplicado, diminuiu a concentração de Hcy para níveis moderados, mas não produziu qualquer efeito na prevenção de eventos cardiovasculares, enfarte do miocárdio ou AVC. Descobriu-se também que os resultados obtidos não variaram entre regiões com e sem fortificação de ácido fólico, ou entre pacientes com maior ou menor concentração de Hcy basal (Pezzini *et al.*, 2007; Ciaccio *et al.*, 2008; Kernan *et al.*, 2014). Deste modo, os resultados apresentados sugerem que o efeito protector verificado pela toma destas vitaminas pode não estar correlacionado com o metabolismo da Hcy (Kotwal *et al.*, 2015).

Neste estudo, houve uma redução de 25% no risco de AVC, sendo este efeito mais notório em pacientes com menos de 70 anos, com hiperlipidémia não tratada e em doentes com hiperhomocisteinémia. Houve uma maior redução do risco de AVC, em

cerca de 4,1%, em indivíduos com concentrações de Hcy acima de 13,8 $\mu\text{mol/L}$. No entanto, a interpretação destes resultados é feita com precaução já que existem múltiplos factores que poderão ter influenciado esta descoberta. Deste modo, uma investigação mais profunda é necessária para validação dos resultados (Debreceeni & Debreceeni, 2014).

Relativamente ao ensaio clínico *Norwegian Vitamin Trial* (NORVIT), este foi um estudo randomizado em dupla ocultação onde foram analisados doentes que tivessem sofrido recentemente enfarte agudo do miocárdio, tendo estes sido acompanhados durante quarenta meses. Neste estudo, os doentes receberam diversas doses de ácido fólico, vitaminas B₆ e B₁₂ ou placebo (Tabela 4). Os resultados obtidos foram semelhantes ao do estudo HOPE 2 e VISP, sem benefício da terapêutica vitamínica na redução do risco cardiovascular. De entre as várias combinações terapêuticas, verificou-se uma redução de cerca de 27% da Hcy plasmática em doentes a receberem ácido fólico. Contudo neste estudo foram levantadas várias questões relativamente à segurança da terapêutica vitamínica combinada, já que os resultados indicam que esta pode ser prejudicial quando aplicada após um episódio de enfarte do miocárdio, pelo que se sugere que não deve ser recomendada (Pezzini *et al.*, 2007; Ciaccio *et al.*, 2008; Ciaccio & Bellia, 2010).

O ensaio clínico randomizado *Women's Antioxidant and Folic Acid Cardiovascular Study* (WAFACS) foi realizado em mulheres com historial clínico de eventos cardiovasculares ou com mais de três factores de risco cardiovascular (Tabela 4). Estas foram acompanhadas durante cerca de 7 anos, sem alcançarem os objectivos propostos de redução do risco cardiovascular, mesmo apesar da redução de 18,5% verificada na concentração de Hcy. Tal como em outros estudos apresentados, também este pode ter sido influenciado pela análise de doentes de países com e sem fortificação obrigatória de cereais (Ntaios, 2015).

O estudo *The B-Vitamin Atherosclerosis Intervention Trial* (BVAIT) concluiu que, numa amostra de indivíduos com baixo risco cardiovascular e níveis de Hcy acima de 8,5 $\mu\text{mol/L}$ submetidos a tratamento com ácido fólico, vitaminas B₆ e B₁₂, houve redução da progressão da aterosclerose. Assim, neste estudo concluiu-se que a suplementação vitamínica travou a progressão desta patologia em indivíduos que apresentem risco cardiovascular diminuto (Ciaccio & Bellia, 2010).

Em 2007, foi apresentado o estudo *Western Norway B-vitamin Intervention Trial* (WENBIT) em pacientes com doença cardíaca. Neste ensaio clínico randomizado os

doentes foram distribuídos por quatro grupos recebendo diferentes terapêuticas, sendo seguidos durante cerca de trinta e seis meses (Tabela 4). Apesar de o estudo ter terminado abruptamente devido às preocupações relativamente à segurança da suplementação vitamínica levantadas pelo estudo NORVIT, este ensaio concluiu que a suplementação vitamínica com vitaminas B₆, B₉ e B₁₂ não tem qualquer efeito na redução do risco de eventos cardiovascular. Esta conclusão vem de encontro ao que foi demonstrado pelos estudos anteriormente referidos, já que não se encontraram diferenças significativas entre os vários grupos de tratamento. A principal limitação deste estudo devem-se ao breve acompanhamento dos doentes, que não permitiu chegar a conclusões significativas bem como o facto de apenas 9,6% dos casos estudados apresentarem hiperhomocisteinémia (European Society of Cardiology, 2007; Ntaios, 2015).

Recentemente, o estudo *Supplementation with Folate, Vitamin B₆ and B₁₂ and/or Omega-3 Fatty Acids* (SU.FOL.OM3) testou a hipótese de um tratamento diário com ácido fólico e vitaminas B₆ e B₁₂ e com ácidos gordos polinsaturados na incidência de AVC, angina instável ou enfarte do miocárdio, visto que estes são factores associados à hiperhomocisteinémia (Tabela 4). Contudo, verificou-se que não se obtiveram alterações significativas no risco de eventos cardiovasculares (Pezzini *et al.*, 2007; Ntaios, 2015).

Além dos estudos supracitados, foi desenvolvido um ensaio clínico em indivíduos com disfunção renal. O *Homocysteinemia in Kidney and End Stage Renal Disease* (HOST), o primeiro ensaio clínico randomizado a investigar a ligação entre a terapêutica com vitaminas B₆, B₉ e B₁₂ e a doença renal crónica ou doença renal avançada (Tabela 4). Os doentes foram acompanhados durante 32 meses tendo-se obtido uma redução nos níveis de Hcy em cerca de 26%. Porém, não foram apresentadas melhorias na prevenção de doenças cardiovasculares (Ntaios, 2015).

O ensaio *Advanced Chronic Kidney Disease* (ACKD) teve, também, como objectivo avaliar os benefícios da redução dos níveis de Hcy em indivíduos com doença renal avançada ou doença renal crónica (Tabela 4). Tal como todos os outros ensaios, também este não conseguiu estabelecer a relação entre a redução dos níveis de Hcy e um menor risco das doenças renais e, logicamente, das doenças cardiovasculares. Estes são resultados consistentes com aqueles apresentados pelo estudo HOPE-2, em indivíduos com doença renal crónica (Ciaccio & Bellia, 2010). Sabe-se que, em doentes

com doença renal crónica a terapêutica com ácido fólico reduz o risco de doenças cardiovasculares em cerca de 15% (Debreceeni & Debreceeni, 2014).

Tabela 4 - Principais ensaios clínicos realizados na última década, e suas características (adaptado de Ciaccio & Bellia, 2010; Ntaios, 2015).

Estudo	Intervenientes	Duração	Tratamento
VISP	3680 indivíduos com AVC	2 anos	Dosagem elevada (25 mg Vit. B ₆ , 0,4 mg Vit B ₁₂ e 2,5 mg ácido fólico) vs Dosagem baixa (200 µg Vit B ₆ , 6 µg Vit B ₁₂ , 20 µg ácido fólico)
VITATOPS	8164 pacientes com AVC ou ataque isquémico transitório	41 meses	2 mg ácido fólico, 25mg Vit. B ₆ e 0,5 mg Vit. B ₁₂ ; placebo
HOPE-2	5522 doentes com doenças vascular ou diabetes	5 anos	2,5 mg ácido fólico, 50 mg Vit B ₆ , 1 mg Vit B ₁₂ ; placebo
NORVIT	3748 indivíduos com enfarte agudo do miocárdio	40 meses	0,8 mg ácido fólico, 0,4 mg Vit B ₁₂ , 40 mg Vit B ₆ ; placebo
WAFACS	5442 mulheres com historial de doença cardiovascular ou 3 ou mais factores de risco	7,3 anos	2,5 mg ácido fólico, 50 mg Vit B ₆ , 1 mg Vit B ₁₂ ; placebo
BVAIT	506 pessoas com níveis de Hcy > 8.5 µmol/L e sem historial de doença cardiovascular ou diabetes	3,1 anos	5 mg ácido fólico, 0,4 mg Vit B ₁₂ , 50 mg Vit B ₆ ; placebo
WESTERN	3090 pacientes com doença cardíaca	36 meses	0,8 mg ácido fólico, 0,4 mg Vit B ₁₂ e 40 mg Vit B ₆ ; 0,8 mg ácido fólico e 0,4 mg Vit B ₁₂ ; 40 mg Vit B ₆ ; placebo
SU.FOL.OM3	2501 doentes com historial de infarto, angina instável ou AVC	56 meses	560 mg ácido fólico, 3 mg Vit B ₆ , 20 mg Vit B ₁₂ ; placebo
HOST	2056 pessoas com doença renal crónica ou doença renal avançada	32 meses	40 mg ácido fólico, 100 mg Vit B ₆ e 2 mg Vit B ₁₂ ; placebo
ACKD	2056 indivíduos com doença renal avançada	3 anos	

Analisando as características dos ensaios clínicos descritos, enumeradas na Tabela 4, verifica-se que em todos houve uma redução nos níveis de Hcy. Tal como esperado, esta diminuição foi mais acentuada nos indivíduos provenientes de países sem fortificação de ácido fólico do que naqueles provenientes de países sem este regime. Contudo, e apesar dos resultados positivos obtidos na redução da concentração de Hcy, estes não foram significativos ao nível da prevenção dos principais eventos cardiovasculares com terapêutica multivitamínica (Clarke *et al.*, 2010; Lee, Hong, Chang, & Saver, 2010; Ji *et al.*, 2013).

Uma das possíveis explicações para os resultados negativos apresentados pelos diferentes ensaios clínicos randomizados pode relacionar-se com limitações inerentes aos estudos retrospectivos e prospectivos bem como aos próprios ensaios clínicos (Wierzbicki, 2007; Ciaccio *et al.*, 2008). De entre estas limitações, a randomização dos ensaios não garante a total eficácia da terapêutica na generalidade da população já que os doentes escolhidos para a realização do ensaio permitem que os factores confundentes, existentes na população em geral, sejam minimizados. Destacam-se, também, o pouco tempo de acompanhamento dos doentes, factor comum a todos os ensaios, que não permite que os resultados obtidos sejam esclarecedores já que patologias como a aterosclerose demoram anos ou mesmo décadas a desenvolverem-se. Além disto, a dimensão da amostra usada é considerada pouco significativa, e a sua heterogeneidade pode ser um factor que influencia os resultados. Outro aspecto importante relaciona-se com a indefinição dos resultados quando comparados países com e sem fortificação. Ou, ainda, os possíveis efeitos adversos que não são considerados e que podem ser apresentados pelas vitaminas B₆, B₉ e B₁₂ usadas nos estudos e ensaios clínicos (Huang *et al.*, 2012; Debreceeni & Debreceeni, 2014; Dayal & Lentz, 2015).

Segundo as guidelines para prevenção de AVC da *American Heart Association* (2015) pacientes com hiperhomocisteinémia leve a moderada deverão receber suplementação de ácido fólico, vitamina B₆ e B₁₂. Sendo que esta, apesar de ter efeito na redução dos níveis de Hcy, não previne a ocorrência de novo AVC ou ataque isquémico transitório. Por outro lado estas recomendações não aconselham a análise dos níveis de Hcy em pacientes sofreram recentemente AVC ou ataque isquémico transitório e que não apresentem outros factores de risco para as patologias cardiovasculares (Kernan *et al.*, 2014).

Apesar de a terapêutica vitamínica ser um potencial método barato de prevenção das doenças cardiovasculares, nenhum dos estudos realizados até à data conseguiram demonstrar, inequivocamente, a ligação entre redução dos níveis de Hcy e a diminuição do risco de eventos cardiovasculares. Assim, actualmente, o uso de vitaminas como agentes de prevenção primária destes eventos tem sido rejeitado. No futuro, serão necessários ensaio clínicos que testem a ligação entre estes dois factores em grupos de alto risco que promovam uma resposta alterada à suplementação vitamínica (Huang *et al.*, 2012; Debreceeni & Debreceeni, 2014; Dayal & Lentz, 2015).

6. Conclusão

As doenças cardiovasculares são um grave problema de saúde pública, sendo das principais causas de morte tanto a nível europeu como a nível mundial, afectando milhões de pessoas todos os anos. Assim, e devido à sua crescente importância e prevalência na população, estas são patologias que têm vindo a ser cada vez mais estudadas pela comunidade científica. O estudo da sua etiologia, dos mecanismos através os quais actuam e as suas consequências para o Homem, permitirão que uma monitorização e prevenção eficazes sejam realizadas.

De entre os factores de risco conhecidos para este tipo de patologias destaca-se a adopção de um estilo de vida saudável como sendo essencial. Contudo, nem todos os casos de disfunção cardiovascular que afectam a população apresentam as causas normalmente associadas a estas patologias. Deste modo, de forma a conhecer melhor estas doenças, e já que os factores de risco tradicionais não conseguem fornecer uma explicação lógica para todos os eventos cardiovasculares, novos factores de risco foram propostos, dos quais se destaca a hiperhomocisteinémia.

A hiperhomocisteinémia é um factor de risco independente para as doenças cardiovasculares e define-se como uma condição que promove a anormal elevação dos níveis de homocisteína em circulação no organismo. A homocisteína é um aminoácido proveniente do metabolismo da metionina, que cuja concentração quando se encontra alterada provoca diversos danos a nível vascular, dando origem à aterosclerose e, consequentemente, a doenças cardiovasculares.

Mesmo apesar de se aceitar que a homocisteína é um aminoácido capaz de provocar, por diferentes mecanismos, danos a nível endotelial ainda não se percebeu a sua verdadeira função neste tipo de patologias. Assim, o papel da hiperhomocisteinémia como causa ou como consequência para as doenças cardiovasculares terá de continuar a ser debatido.

Devido à natureza complexa e multifactorial das doenças cardiovasculares novos estudos serão, ainda, necessários de forma a avaliar a correcta interacção entre a hiperhomocisteinémia e estas doenças. Um dos factores a ter em consideração, no estudo mais aprofundado desta questão, serão os polimorfismos genéticos e a sua interacção com os diversos factores de risco considerados para as doenças cardiovasculares.

A correcta determinação da homocisteína plasmática permite a identificação precoce de hiperhomocisteinémia em pacientes que possuam elevado risco cardiovascular e, desta forma, possibilita que a prevenção das mesmas seja feita correctamente e com resultados de maior sucesso. Assim, é de extrema importância que as técnicas de quantificação da homocisteína sejam mais eficazes que as que actualmente existem. É necessário poder determinar-se a concentração de cada uma das formas que a homocisteína apresenta em circulação para um correcto diagnóstico da hiperhomocisteinémia, já que diferenças mínimas da sua concentração são relevantes. Além disto, a quantificação das diferentes formas de Hcy em circulação é importante na percepção da ligação deste aminoácido às doenças cardiovasculares, já que esta relação poderá passar por uma destas formas. Actualmente estas formas ainda não consideradas já que os estudos até agora realizados apenas consideram a Hcy plasmática total. O desenvolvimento de técnicas que permitam a análise dos seus diversos metabolitos da Hcy é imprescindível na detecção precoce das doenças cardiovasculares. Também a procura de uma técnica de detecção que permita a análise da hiperhomocisteinémia na prática clínica, em doentes que apresentem elevado risco cardiovascular, é fundamental na prevenção deste tipo de patologias.

Por outro lado, serão necessários mais ensaios que determinem a efectividade da suplementação vitamínica na redução do risco das doenças cardiovasculares. Apesar de este ser um método de tratamento simples e económico que permite a redução dos níveis de homocisteína, a sua eficácia na redução do risco vascular continua por provar. Os resultados contraditórios obtidos pelos estudos retrospectivos e prospectivos, bem como os resultados pouco significativos obtidos nos ensaios clínicos são factores que necessitam de maior investigação. Desta forma, no futuro, o desenvolvimento de novas opções terapêuticas será imprescindível na contenção e erradicação destas patologias.

No futuro, será necessário o investimento da comunidade científica no entendimento do valor da homocisteína. O conhecimento mais aprofundado dos mecanismos através dos quais actua na promoção das doenças cardiovasculares é essencial. Além disto, será necessário o desenvolvimento de novas técnicas que permitam a quantificação deste aminoácido, de forma a possibilitar uma análise mais simples e eficaz que permita a sua introdução nos exames de rotina realizados pelos pacientes com elevado risco cardiovascular. Também o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, ou o aperfeiçoamento daquelas actualmente existentes, será imprescindível para um correcto tratamento da hiperhomocisteinémia.

Bibliografia

- Agui, L., Penafarfal, C., Yanezsedeno, P., & Pingarron, J. (2007). Electrochemical determination of homocysteine at a gold nanoparticle-modified electrode. *Talanta*, 74(3), 412–420.
- Ariogul, S., Cankurtaran, M., Dağlı, N., Khalil, M., & Yavuz, B. (2005). Vitamin B12, folate, homocysteine and dementia: are they really related? *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 40(2), 139–146.
- Blasco, C., Caballería, J., Deulofeu, R., Lligoña, A., Parés, A., Lluís, J. M., ... Rodés, J. (2005). Prevalence and mechanisms of hyperhomocysteinemia in chronic alcoholics. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 29(6), 1044–1048.
- Brustolin, S., Giugliani, R., & Félix, T. M. (2010). Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(1), 1–7.
- Cardoso, I. L. (2009). Homocisteína e a doença cardiovascular. *Revista Da Faculdade de Ciencias Da Saúde*, 6, 198–206.
- Cevasco, G., Piątek, A. M., Scapolla, C., & Thea, S. (2010). An improved method for simultaneous analysis of aminothiols in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1217(14), 2158–2162.
- Christopher, R., Nagaraja, D., & Shankar, S. K. (2007). Homocysteine and cerebral stroke in developing countries. *Current Medicinal Chemistry*, 14(22), 2393–2401.
- Ciaccio, M., & Bellia, C. (2010). Hyperhomocysteinemia and cardiovascular risk: effect of vitamin supplementation in risk reduction. *Current Clinical Pharmacology*, 5(1), 30–36.
- Ciaccio, M., Bivona, G., & Bellia, C. (2008). Therapeutical approach to plasma homocysteine and cardiovascular risk reduction. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(1), 219–224.

- Clarke, R., Halsey, J., Lewington, S., Lonn, E., Armitage, J., Manson, J. E., ... Bo, K. H. (2010). Effects of lowering homocysteine levels with B Vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality. *Archives of Internal Medicine*, 170(18), 1622–1631.
- Currò, M., Gugliandolo, A., Gangemi, C., Risitano, R., Ientile, R., & Caccamo, D. (2014). Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. *Neurochemical Research*, 39(8), 1485–1495.
- Dayal, S., & Lentz, S. R. (2015). Homocysteine: a controversial cardiovascular risk factor. In H. Wang & C. Patterson (Eds.), *Atherosclerosis: Risks, Mechanisms, and Therapies* (pp. 53–62). John Wiley & Sons, Inc. Disponível em: <https://books.google.pt/books?id=TeEbBgAAQBAJ&pg=PA500&dq=Atherosclerosis:+Risks,+Mechanisms,+and+Therapies&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CB4Q6wEwAGoVChMI3JyDk4PjyAIVS1cUCh0RPAsB#v=onepage&q&f=false>.
- Debreceeni, B., & Debreceeni, L. (2014). The role homocysteine-lowering B-vitamins in the primary prevention of cardiovascular disease. *Cardiovascular Therapeutics*, 32, 130–138.
- Direcção-Geral da Saúde. (2012). *Programa nacional para as doenças cerebro-cardiovasculares: orientações programáticas*. Disponível em <https://www.dgs.pt/programas-de-saude-prioritarios.aspx>.
- Direcção-Geral da Saúde. (2015). *A saúde dos portugueses- perspectiva 2015*. Disponível em <https://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/a-saude-dos-portugueses-perspetiva-2015.aspx>.
- Ducros, V., Demuth, K., Sauvante, M. P., Quillard, M., Caussé, E., Candito, M., ... Gerhardt, M. F. (2002). Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results. *Journal of Chromatography B*, 781, 207–226.
- Esper, R. J., Nordaby, R. a, Vilariño, J. O., Paragano, A., Cacharrón, J. L., & Machado, R. a. (2006). Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology*, 5(4), 1–18.

- European Society of Cardiology (2007). WENBIT – WESTERN NORWAY B-VITAMIN INTERVENTION TRIAL [em linha]. *European Society of Cardiology Web site*. Acedido em Outubro 15, 2015, em <http://www.escardio.org/The-ESC/Press-Office/Press-releases/Archives/Ebbing-hotline-III-homocysteine-and-CVD-risk-Title-Lowering-homocysteine-with>.
- Faeh, D., Chiolero, A., & Paccaud, F. (2006). Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *Swiss Medical Weekly*, 136(47-48), 745–756.
- Fei, S., Chen, J., Yao, S., Deng, G., He, D., & Kuang, Y. (2005). Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at carbon nanotube electrode modified with platinum. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 29–35.
- Ferreira, R. C., Neves, R. C. das, & Rodrigues, V. (2014). *Portugal- Doenças cérebro-cardiovasculares em números – 2014*. Lisboa. Disponível em <http://www.dgs.pt/?cr=26605>.
- Ganguly, P., & Alam, S. F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease, 14(1), 1–10.
- Garel, J., & Tawfik, D. S. (2006). Mechanism of hydrolysis and aminolysis of homocysteine thiolactone. *Chemistry - A European Journal*, 12, 4144–4152.
- Głowacki, R., & Bald, E. (2009). Fully automated method for simultaneous determination of total cysteine, cysteinylglycine, glutathione and homocysteine in plasma by HPLC with UV absorbance detection. *Journal of Chromatography B*, 877(28), 3400–3404.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). Metabolismo dos Lípidos. In *Tratado de Fisiologia Médica* (12ª Edição) (pp. 870–873). Elsevier Editora.
- Herrmann, W., Herrmann, M., & Obeid, R. (2007). Hyperhomocysteinaemia: a critical review of old and new aspects. *Current Drug Metabolism*, 8(1), 17–31.
- Herrmann, W., & Obeid, R. (2011). Homocysteine: A biomarker in neurodegenerative diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(3), 435–441.

- Huang, T., Chen, Y., Yang, B., Yang, J., Wahlqvist, M. L., & Li, D. (2012). Meta-analysis of B vitamin supplementation on plasma homocysteine, cardiovascular and all-cause mortality. *Clinical Nutrition*, 31(4), 448–54.
- Isokawa, M., Kanamori, T., Funatsu, T., & Tsunoda, M. (2014). Analytical methods involving separation techniques for determination of low-molecular-weight biothiols in human plasma and blood. *Journal of Chromatography B*, 964, 103–115.
- Jakubowski, H. (2006). Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *Journal of Nutrition*, (136), 1741S–1749S.
- Jakubowski, H. (2008). The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone mediated vascular disease. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(9), 155–167.
- Ji, Y., Tan, S., Xu, Y., Chandra, A., Shi, C., Song, B., ... Gao, Y. (2013). Vitamin B supplementation, homocysteine levels, and the risk of cerebrovascular disease: a meta-analysis. *American Academy of Neurology*, 81(15), 1298–307.
- Kernan, W.N., Ovbiagele, B., Black, H. R., Bravata, D. M., Chimowitz, M. I., Ezekowitz, M. D., ... Wilson, J.A.; em nome de American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Clinical Cariology, and Council on Peripheral Vacular Disease. Guidelines for the prevention of strojke in patients with stroke and trasient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014; 45.
- Kotwal, J., Kotwal, A., Bhalla, S., Singh, P. K., & Nair, V. (2015). Effectiveness of homocysteine lowering vitamins in prevention of thrombotic tendency at high altitude area: A randomized field trial. *Thrombosis Research*, 136(4), 758–762.
- Lentz, S. R. (2005). Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), 1646–1654.

- Lowell, C. (2004). Métodos laboratoriais clínicos para a detecção de antígenos e anticorpos. In *Imunologia Médica* (10^a Edição) (pp. 185–201). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, S.A.
- Malaguarnera, M., Ferri, R., Bella, R., Alagona, G., Carnemolla, A., & Pennisi, G. (2004). Homocysteine, vitamin B12 and folate in vascular dementia and in Alzheimer disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42(9), 1032–1035.
- Mangge, H., Becker, K., Fuchs, D., & Gostner, J. M. (2014). Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. *World Journal of Cardiology*, 6(6), 462–477.
- Mattson, M. P., & Shea, T. B. (2003). Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*, 26(3), 137–146.
- McGill, H. C., McMahan, C. A., & Gidding, S. S. (2008). Preventing heart disease in the 21st century: Implications of the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY) study. *Circulation*, 117(9), 1216–1227.
- McMenamin, M. E., Himmelfarb, J., & Nolin, T. D. (2009). Simultaneous analysis of multiple aminothiols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 877(28), 3274–3281.
- Mendis, S., Puska, P., & Norrving, B. (2011). *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. Geneva.
- Mu, X., Zhao, S., Huang, Y., & Ye, F. (2012). Use of capillary electrophoresis with chemiluminescence detection for sensitive determination of homocysteine. *Journal of Separation Science*, 35(2), 280–285.
- Nekrassova, O., Lawrence, N. S., & Compton, R. G. (2003). Analytical determination of homocysteine: a review. *Talanta*, 60(6), 1085–1095.

- Nelson, B. C., Satterfield, M. B., Sniegowski, L. T., & Welch, M. J. (2005). Simultaneous quantification of homocysteine and folate in human serum or plasma using liquid chromatography / tandem mass spectrometry on stable isotope-dilution liquid chromatography / tandem. *Analytical Chemistry*, 77(11), 3586–3593.
- Nolin, T. D., McMenamin, M. E., & Himmelfarb, J. (2007). Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: Application to studies of oxidative stress. *Journal of Chromatography B*, 852(1-2), 554–561.
- Ntaios, G. (2015). Homocysteine, B Vitamins, and cardiovascular risk. In R. R. Watson (Ed.), *Foods and Dietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults* (pp. 309–318). Elsevier Inc. Disponível em: <https://books.google.pt/books?id=fNacBAAQBAJ&pg=PR16&dq=Foods+and+Dietary+Supplements+in+the+Prevention+and+Treatment+of+Disease+in+Older+Adults&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CB0Q6AEwAGoVChMIxM3Si6LjyAIVx0YUCh06nAyd#v=onepage&q=Foods and Dietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults&f=false>.
- Obeid, R., & Herrmann, W. (2006). Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Letters*, 580(13), 2994–3005.
- Peixoto, C. (2013). *Desenvolvimento de métodos expeditos para quantificação de cisteína / cistina* (Tese de Mestrado). Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.
- Perk, J., De Backer, G., Gohlke, H., Graham, I., Reiner, Z., Verschuren, M., ... Wolpert, C. (2012). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *European Heart Journal*, 33(13), 1635–1701. <http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs092>.
- Perła-kaja, J., & Jakubowski, H. (2012). Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids*, 43, 1405–1417.

- Perla-Kajan, J., & Jakubowski, H. (2010). Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. *The FASEB Journal*, 24(3), 931–936.
- Perla-Kaján, J., Twardowski, T., & Jakubowski, H. (2007). Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids*, 32(4), 561–572.
- Pezzini, A., Del Zotto, E., & Padovani, A. (2007). Homocysteine and cerebral ischemia: pathogenic and therapeutical implications. *Current Medicinal Chemistry*, 14(3), 249–263.
- Powers, H. J., & Moat, S. J. (2000). Developments in the measurement of plasma total homocysteine. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 3, 391–397.
- Rafii, M., Elango, R., Courtney-Martin, G., House, J. D., Fisher, L., & Pencharz, P. B. (2007). High-throughput and simultaneous measurement of homocysteine and cysteine in human plasma and urine by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 371(1), 71–81.
- Rafii, M., Elango, R., House, J. D., Courtney-Martin, G., Darling, P., Fisher, L., & Pencharz, P. B. (2009). Measurement of homocysteine and related metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877(28), 3282–3291.
- Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Martelli, M., Servadei, L., Brunetti, N., ... Licastro, F. (2005). Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(3), 636–643.
- Salehzadeh, H., Mokhtari, B., & Nematollahi, D. (2014). Selective electrochemical determination of homocysteine in the presence of cysteine and glutathione. *Electrochimica Acta*, 123, 353–361.
- Sawuła, W., Banecka-Majkutewicz, Z., Kadziński, L., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Wegrzyn, G., Nyka, W., & Banecki, B. (2008). Improved HPLC method for total plasma homocysteine detection and quantification. *Acta Biochimica Polonica*, 55(1), 119–125.

- Sharma, M., Rai, S. K., Tiwari, M., & Chandra, R. (2007). Effect of hyperhomocysteinemia on cardiovascular risk factors and initiation of atherosclerosis in Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, 574(1), 49–60.
- Silva, A. S., Brazão, M. L., Granito, S., Escórcio, S., Jardim, M., Silva, S., ... Araújo, J. N. (2010, January). Distúrbios pró-trombóticos / trombofilias. *Revista Da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*, 17, 49–64.
- Stampfer, M., & Willett, W. (2015). Folate Supplements for stroke prevention targeted trial trumps the rest. *Jama*, 313(13), 1321–1322. <http://doi.org/10.1001/jama.2015.2274.2>.
- Steed, M. M., & Tyagi, S. C. (2011). Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1927–1943.
- Tomaiuolo, M., Vecchione, G., Margaglione, M., Pisanelli, D., & Grandone, E. (2009). Stable-isotope dilution LC–ESI-MS/MS techniques for the quantification of total homocysteine in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 877(28), 3292–3299.
- Ubbink, J. B. (2000). Assay methods for the measurement of total homocyst(e)ine in plasma. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 26(3), 233–241.
- Van Dam, F., & Van Gool, W. a. (2009). Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease: a systematic review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 48(3), 425–430.
- Vannucchi, H., & Melo, S. S. (2009). Hiper-homocisteinemia e risco cardiometabólico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53(5), 540–549.
- Wang, H., Tan, H., & Yang, F. (2005). Mechanisms in homocysteine-induced vascular disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2(1), 25–31.
- Wang, W., Rusin, O., Xu, X., Kim, K. K., Escobedo, J. O., Fakayode, S. O., ... Strongin, R. M. (2005). Detection of homocysteine and cysteine. *Journal of the American Chemical Society*, 127(45), 15949–15958.

- Weiss, N., Keller, C., Hoffmann, U., & Loscalzo, J. (2002). Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vascular Medicine*, 7, 227–239.
- Wierzbicki, A. S. (2007). Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 4(2), 143–150.
- Yilmaz, N. (2012). Relationship between paraoxonase and homocysteine: crossroads of oxidative diseases. *Archives of Medical Science*, 8(1), 138–153.
- Zappacosta, B., Mastroiacovo, P., Persichilli, S., Pounis, G., Ruggeri, S., Minucci, A., ... Iacoviello, L. (2013). Homocysteine lowering by folate-rich diet or pharmacological supplementations in subjects with moderate hyperhomocysteinemia. *Nutrients*, 5(5), 1531–1543.
- Zappacosta, B., Persichilli, S., Minucci, A., Scribano, D., Baroni, S., Fasanella, S., ... De Sole, P. (2006). Evaluation of a new enzymatic method for homocysteine measurement. *Clinical Biochemistry*, 39(1), 62–66.
- Zhou, J., & Austin, R. C. (2009). Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: causal relationship and potential mechanisms. *BioFactors*, 35(2), 120–129.
- Zhou, S., Zhang, Z., & Xu, G. (2014). Notable epigenetic role of hyperhomocysteinemia in atherogenesis. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 134.
- Zhuo, J. M., Wang, H., & Praticò, D. (2011). Is hyperhomocysteinemia an Alzheimer's disease (AD) risk factor, an AD marker, or neither? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(9), 562–571.